



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPESP  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA  
E APLICADA - PPGIBA**



**PERFIL DA RESPOSTA IgG3 CONTRA PAINEL DE  
PROTEÍNAS VARIANTES DO BLOCO 2 DA MSP1  
PREDIZ MALÁRIA VIVAX ASSINTOMÁTICA**

**ELIZANGELA FARIAS DA SILVA**

**Manaus - AM  
2019**

**PERFIL DA RESPOSTA IgG3 CONTRA PAINEL DE  
PROTEÍNAS VARIANTES DO BLOCO 2 DA MSP1  
PREDIZ MALÁRIA VIVAX ASSINTOMÁTICA**

**ELIZANGELA FARIAS DA SILVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como avaliação do exame de defesa de Doutorado para a obtenção do título de Doutor em Imunologia na área de concentração IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA.

**ORIENTADOR: Dr. Paulo Afonso Nogueira**

**Manaus - AM  
2019**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586p Silva, Elizangela Farias da  
Perfil da resposta IgG3 contra painel de proteínas variantes do bloco 2 da MSP1 prediz Malária vivax assintomática: Produção de antígenos recombinantes variantes do bloco-2 da PvMSP1 para avaliação da resposta humoral de indivíduos residentes na comunidade Rio Pardo, região endêmica para malária no Amazonas/ Elizangela Farias da Silva, 2019  
85 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Paulo Afonso Nogueira  
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Assintomático. 2. antigenicidade. 3. diagnóstico rápido. 4. elimina malária. 5. Plasmodium vivax. I. Nogueira, Paulo. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Dr. Paulo Afonso Nogueira, presidente  
Instituto Leonidas e Maria Deane – ILMD – Fiocruz Amazonia

Dr<sup>a</sup>. Aya Sadahiro, membro  
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Dr<sup>a</sup>. Bárbara José Antunes Baptista, membro  
Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema – IPCCB/FMT

Dr<sup>a</sup>. Djane Clarys Baia da Silva, membro  
Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema – IPCCB/FMT

Dr. Vanderson Sampaio  
Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema – IPCCB/FMT

**APROVADA EM: 21/06/2019**

# *Dedicatória*

## **Às três mulheres da minha vida, meus pilares...**

À minha querida mãe Ana Maria Farias da Silva, pelo dom da vida, pelos ensinamentos e por não desistir de árdua missão de ser pai/mãe de três filhos sozinha.

Obrigada por nunca ter permitido que nós passássemos necessidade. Obrigada por sempre acreditar em DEUS e na justiça dele em nossas vidas. Obrigada por sempre me mostrar a sua fé, ela é inigualável e inabalável. Saiba que apesar de eu não ser boa na oratória, eu te admiro muito e agradeço a DEUS pela sua vida. E peço a ele que prolongue seus dias sobre a terra, para usufruir ao meu lado, tudo aquilo que plantasse comigo.

À minha tia-madrinha Alcilene Farias da Silva, que sempre esteve ao lado da minha mãe, dando-lhe apoio moral, emocional e financeiro. Obrigada por todo apoio, amor e carinho que você me deu. Que a vida lhe dê em dobro, tudo aquilo que você fez por nós. Admiro muito você e peço à DEUS que prolongue seus dias sobre a terra, para usufruir ao meu lado, tudo aquilo que plantamos juntas.

À minha avó materna Itelvina Farias da Silva (*in memoriam*), por todo ensinamento que me foi passado, antes da sua morte. “Vó, os dez anos que vivi ao seu lado, foram essenciais para formar quem eu sou hoje. Foram anos de muito ensinamento e aprendizagem. Você me ensinou muito mais que os dez anos de vida acadêmica fora capaz de me ensinar. Você me ensinou a enxergar o mundo como ele realmente é, e isso me ajudou a ir longe. Quem diria vó, que a sua neta ia ser doutora? Eu só queria que você também usufrísse disso, mas DEUS precisou de você e tudo bem, eu entendo!”.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a DEUS por se fazer presente em todos os momentos difíceis da minha vida, e não foi diferente nessa etapa do doutorado, me dando força para prosseguir e não desistir;

À minha avó materna Itelvina (*in memorian*) que mesmo ausente, sempre esteve presente em minha memória, com seus conselhos e ensinamentos, adubados durante minha infância e que me guiam até os dias atuais.

À minha mãe Ana Maria, pela vida e por todo apoio que me destes dentro de suas limitações. Obrigada por estar sempre do meu lado. Amo você!

À minha tia Alcilene, por todo apoio moral, emocional e financeiro me dado nessa etapa da minha vida. Obrigada por sempre está do meu lado. Amo você!

Ao meu irmão Elison Farias da Silva, por todo apoio em momentos difíceis, por todo conhecimento repassado e por todo tempo compartilhado nesses quatro anos de doutorado. Eu amo você, e saber que tens orgulho de mim, me deixa orgulhosa também, afinal, você é um cara muito inteligente. Obrigada por exaltar sempre, minha força e meu valor, coisas que por muito tempo eu não via.

Ao meu irmão Everton Farias da Silva, por todo apoio e palavras de conforto que traz quando necessário. Você representa a paz para mim. Ver sua calma e o discernimento que tens para resolver os problemas me deixa orgulhosa, a ponto de querer ser como você. Obrigada também pelo nosso tesouro chamado Maria Sarah. Eu amo vocês.

Ao meu tio Beto, que mesmo sem obrigação nenhuma, fez o papel de pai em minha vida. Obrigada tio!

Aos meus primos Alan e Arlinson pela força e momentos ímpares que fazia meus dias mais felizes.

A minha família pela compreensão perante a minha ausência em momentos tristes e alegres. Confesso que no início, eu não conseguir equilibrar minha rotina de doutorado, com a carreira de docente e ciclo social. E quando eu tive que escolher o que sacrificar, eu sacrifiquei meus compromissos sociais com meus familiares. Obrigada!

Ao meu afilhado Samir, obrigada pela compreensão em relação a minha ausência. Eu amo você!

Ao Dr. Paulo Afonso Nogueira, primeiramente por acredita em mim, pela orientação, conhecimento compartilhados e incentivo em momentos necessários. Obrigada por tudo!

Ao Dr. Luiz André Mariúba, pela orientação e conhecimento compartilhado, estes que foram essenciais para produção das proteínas recombinantes. Minha eterna gratidão.

À Maria Edilene, Juliane Correa, Késsia Caroline e Fernanda de Almeida Batalha por todo apoio e experiência compartilhada para o desenvolvimento e melhoramento de protocolos para produção de proteínas recombinantes. Obrigada Meninas das proteínas.

A turma do café com ciência, Tatiana Bacry, Ivanildes, Gleyce Félix, Danielle Furtado, Wellington Gama e Yury Chaves por nossos momentos do café e conhecimento compartilhado, apoio emocional e momentos tensos durante o desenvolvimento dos experimentos do doutorado.

Aos demais colegas do grupo de pesquisa DCDIA (Diagnóstico e Controle de Doenças Infeciosas da Amazonia)

Os meus amigos da Nilton Lins, profa. Elen Monteiro, prof. Bem-Hur Dutra, profa. Valeria Sobral, profa Aline Rezende e ao prof. Paulo Roberto, por momentos maravilhosos que passamos juntos, desenvolvendo um belíssimo trabalho no Colegiado do curso de Ciências Biológicas da Nilton Lins.

A Paloma Dantas, Andreia Ferreira e Mayana Pardo, por serem ombros amigos em horas essenciais.

Aos meus amigos Embrapianos, Sandra, Atila, Ariane Máximo, Ana Mara, Joelma e Atila, por me proporcionar momentos felizes ao lado de vocês.

A todos os funcionários do instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD, Fiocruz Amazônia. Dos funcionários da limpeza a diretoria de pesquisa, por nos proporcionar um ambiente limpo e seguro para o desenvolvimento dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada e a todos os professores pela realização pela formação e realização de um sonho.

À Universidade Federal do Amazonas, por proporcionar minha formação acadêmica.

A CAPES pelo apoio financeiro ao projeto e concessão da bolsa.

AGRADEÇO

*"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."*

(Arthur Schopenhauer)

*"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano."*

(Isaac Newton)

*"A ignorância gera mais confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não os que sabem muito, que afirmam positivamente que esse ou aquele problema nunca pode ser resolvido pela ciência"*

(Charles Darwin)

## RESUMO

A malária é um sério problema de saúde pública mundial, onde 3,2 bilhões de indivíduos residem em áreas de risco. As infecções de malária por *Plasmodium vivax* são amplamente distribuídas na região das Américas e responsável por 80% dos casos no Brasil. A última década presenciou grandes avanços nas estratégias de combate e eliminação da malária global, o que culminou no declínio do número de casos notificados e óbitos. Esses avanços trouxeram otimismo para elaborar metas ambiciosas, como a redução global em pelo menos 90% de casos de malária e as taxas de mortalidade até 2030. Dentre os desafios a serem superados, está o rastreamento dos casos assintomáticos, pois apesar da falta de sintomas e da baixa parasitemia, esses indivíduos são reservatórios parasitário e contribuem para a incidência de malária. Como estratégia, a captura de anticorpos antígeno-específicos de malária, usando antígenos polimórficos, se mostra uma ferramenta eficaz para a detecção de casos assintomáticos, por sua maior cobertura e possibilidade de reconhecimento dos anticorpos. Visto isso, o presente trabalho avaliou a resposta humoral contra um painel de proteínas variantes, baseado no polimorfismo da região do Bloco 2 da Proteína-1 de Superfície de Merozoito de *Plasmodium vivax* (PvMSP1) para investigação de anticorpos antígeno-específicos, como método de identificação de indivíduos assintomáticos a malária pelo *P. vivax*. Foram produzidas cinco proteínas recombinantes variantes da região do Bloco 2 da PvMSP1 (P2, P4, P5, P6 e P5) para a investigação de anticorpos antígeno-específico e quantificação de IgG total e subclasse (IgG1, IgG2 e IgG3), em soros de indivíduos com malária vivax assintomática, sintomática e não infectados. Os níveis de IgG total foram quantificados para cada proteína variante (P2, P4, P5, P6 e P7) e todos os soros responderam para pelo menos uma proteína, porém em níveis diferentes. A caracterização das subclasses indicou que IgG1 e IgG3 foram predominaram na resposta contra as variantes, enquanto a subclasse IgG2 mostrou baixa reatividade. A partir deste ponto, os indivíduos não infectados mostraram que a subclasse IgG1 foi predominante pelo menos com as proteínas P2, P4, P5 e P6. Enquanto a IgG3 foi mais predominante nos assintomáticos e menos frequentes no grupo de indivíduos não infectados. Considerando a sensibilidade e especificidade de cada proteína para detecção de níveis de IgG

total e subclasse e assim predizer quais as proteínas usar para diferenciar o grupo dos assintomáticos dos não infectados, vimos que a P2 seria uma proteína promissora, mostrando de 100% de sensibilidade para captar anticorpos IgG e a subclasse IgG3 e apresentando uma especificidade de 76% para IgG3. Os valores de razões de verossimilhança dos indivíduos assintomáticos com soropositividade de IgG total e as subclasses IgG3 para as proteínas P4, P5 e P7 mostraram valores preditivos importantes.

Conclusão: Nossos achados revelaram que o painel de variantes Bloco 2 do PvMSP-1 e sorologia subclasses IgG específica pode guiar o uso racional para criação de uma ferramenta de detecção de casos assintomáticos de malária vivax como estratégia para eliminação da malária.

**Palavras chaves:** assintomático, antigenicidade, diagnóstico rápido, elimina malária, *Plasmodium vivax*.

## ABSTRACT

Malaria is a serious public health problem worldwide, where 3.2 billion people live in areas at risk, infections malaria with *Plasmodium vivax* widely distributed in the Americas and accounting for 80% of cases in Brazil. The last decade witnessed major advances in strategies to combat and eliminate global malaria, which culminated in a decline in the number of cases reported and deaths. These advances have brought optimism to the achievement of ambitious targets, such as the global reduction in at least 90% of malaria cases and mortality rates by 2030. Among the challenges to be overcome is the tracking of asymptomatic cases, since despite the lack of symptoms and low parasitemia, these individuals are parasitic reservoirs and contribute to the incidence of malaria. As a strategy, the capture of antigen-specific malaria antibodies, using antigens polymorphic, is an effective tool for the detection of asymptomatic cases, because of their greater coverage and the possibility of recognition of antigen-specific antibodies. Given this, the present work evaluated a panel of variant proteins, based on the polymorphism of the Block 2 region of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 (PvMSP1) for the investigation of antigens specific as a method of identifying asymptomatic malaria individuals by *P. vivax*. Were produced five proteins recombinant variant the Block-2 of PvMSP1 (P2, P4, P5, P6 and P5), for the investigation of antibodies antigen-specific and quantification of IgG total and subclasses (IgG1, IgG2 and IgG3), in serum from individuals with vivax malaria asymptomatic, symptomatic and non-infected. Total IgG levels were quantified for each protein variant (P2, P4, P5, P6 and P7) and all serum responded to at least one protein, but at different levels. The characterization of the subclasses indicated that IgG1 and IgG3 were predominant in the response against the variants, while the IgG2 subclass showed low reactivity. From this point, individuals uninfected the subclass IgG1 showed predominant that was at least with the P2, P4, P5 and P6 proteins. While IgG3 was more prevalent in the asymptomatic and less frequent in the group of uninfected individuals. Considering the sensitivity and specificity of each protein for detecting total and subclass IgG levels and thus predicting which proteins to use to differentiate the group

from asymptomatic non-infected individuals, we saw that P2 would be a promising protein, showing 100% sensitivity to capture IgG antibodies and the IgG3 subclass and have a specificity of 76% for IgG3. The values of likelihood ratios of individuals asymptomatic with seropositivity IgG total and subclasses IgG3 for proteins P4, P5 and P7 showed important predictive values.

Conclusion: Our findings revealed that the panel of variants Block 2 of the PvMSP-1 serology and subclasses specific IgG can guide the rational use to create a tool for detection of asymptomatic cases of vivax malaria as a strategy for elimination of malaria.

**Key words:** asymptomatic, antigenicity, rapid diagnosis, eliminates malaria, *Plasmodium vivax*.

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 - Mapa das áreas de risco para Transmissão da Malária no Mundo</i>	23
<i>Figura 2 - Distribuição do número de casos de malária mundial, no período de 2010 a 2017</i>	24
<i>Figura 3 - Classificação das regiões endêmicas no território brasileiro conforme o IPA.</i>	26
<i>Figura 4 - Distribuição dos casos autóctones de Malária no Brasil, no período de 2004 a 2017</i>	26
<i>Figura 5 - - Ciclo de vida do Plasmodium spp</i>	28
<i>Figura 6 - Mecanismos efetores dos anticorpos contra merozoíto</i>	36
<i>Figura 7 - Etapa de processamento e clivagem da MSP1</i>	37
<i>Figura 8 - Esquema da estrutura da Proteína-1 de Superfície de Merozoíto (MSP1).</i>	39
<i>Figura 9 - Sequência dos haplótipos circulantes na Região de Manaus.</i>	41
<i>Figura 10 - Agrupamento dos soros de indivíduos residentes na comunidade Rio Pardo</i>	46
<i>Figura 11 - Mosaico da diversidade do Bloco-2 da PvMSP1</i>	11
<i>Figura 12 - Representação esquemática do mapa físico do vetor de expressão pSMART</i>	49
<i>Figura 13 - Esquema metodológico para produção das variantes do Bloco-2 da PvMSP1</i>	51
<i>Figura 14 - Análise da purificação das proteínas recombinantes variantes do bloco 2 da PvMSP1</i>	58
<i>Figura 15 - Percentual de IgG total anti proteínas recombinantes variantes do Bloco-2 da PvMSP-1.</i>	59
<i>Figura 16 - Percentual de IgG1 anti proteínas recombinantes variantes do Bloco-2 da PvMSP-1</i>	60
<i>Figura 17 - Percentual de IgG2 anti proteínas recombinantes variantes do Bloco-2 da PvMSP-1</i>	61
<i>Figura 18 - Percentual de IgG3 anti proteínas recombinantes variantes do Bloco-2 da PvMSP-1</i>	62
<i>Figura 19 - Níveis de IgG total e Subclasses (IgG1, IgG2 e IgG3) em sintomáticos para malária vivax.</i>	66
<i>Figura 20 - Níveis de IgG total e Subclasses (IgG1, IgG2 e IgG3) em assintomáticos para malária vivax.</i>	67
<i>Figura 21 - Níveis de IgG total e Subclasses (IgG1, IgG2 e IgG3) em indivíduos não-infectados.</i>	68
<i>Figura 22 - Descrição da soroprevalencia de todos os soros testados.</i>	72
<i>Figura 23 - Análise univariada entre soros de assintomáticos e não-infectados</i>	73
<i>Figura 24 - Análise de regressão logística multivariada</i>	74

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Sensibilidade e especificidade das proteínas variantes do bloco 2 da PvMSP1</i>	64
<i>Tabela 2 - Teste de comparação múltipla de Dunnett</i>	69

**LISTA DE SIGLAS**

ACTs: Artemisinina;

ADCI: Inibição Celular Dependente de Anticorpos;

ADCC: Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos;

BSA: Bovine Serum Albumin;

CBs: Blocos Conservados;

CTLs: Linfócitos T citotóxicos;

DCDIA: Laboratório Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazônia;

D.O: Densidade Óptica;

dB: Decibéis;

DTT: Ditiotreitól;

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorent Assay;

GPI: Glicosilfosfatidilinositol;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogénio;

H<sub>2</sub>O: Água;

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido Sulfúrico;

HLA I: Antígeno leucocitário de classe I;

HLA II: Antígeno leucocitário de classe II;

ICBs: Blocos Conservados Interespécies;

IDT: *Integrated DNA Technologies*;

IFN- $\gamma$ : Interferon gama;

IL: Interleucina;

IgG: Imunoglobulina G;

IMAC: Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado;

IPA: Índice Parasitário Anual;

IRS: “*Indoor residual spraying*”;

ITNs: “*Insecticide-treated mosquito nets*”;

KC: Células de Kupffer;

LB: Luria Bertani;

M: Molar;

mL: Mililitros;

MSP: Proteínas de Superfície do Merozoíto;

MSP-1: Proteína-1 de Superfície do Merozoíto;

mM: Milimolar;

NK: *Natural Killer*;

NaCl: Cloreto de Sódio;

nm: Nanómetro;

OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde;

OMS: Organização Mundial da Saúde;  
PBS: Tampão Fosfato-Salino;  
PNG: Papua Nova Guiné;  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase;  
PSA: Persulfato de Amônia;  
PMSF:  
pH: Potencial Hidrogeniônico;  
rRNA: Ácido Ribonucleico Ribossômico;  
RPM: Rotações Por Minuto;  
SUB1: Subtilisina-like;  
SDS: Dodecil sulfato de sódio;  
Sp.: Espécie;  
Spp.: Espécies;  
SNP: Polimorfismo de Único Nucleotídeo;  
TMB: Tetrametilbenzidina;  
TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral alfa;  
TGF- $\beta$ : Fator de Crescimento Transformante Beta;  
Tris: Hidroximetil;  
V: Volts;  
 $\mu$ l/mL: Microlitro por mililitro;  
 $\mu$ l: Microlitro;

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1.	Epidemiologia da Malária .....	23
2.2.	Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro vertebrados.....	27
2.3.	Patogênese da malária .....	30
2.4.	Tratamento e profilaxia .....	31
2.5.	Mecanismos efetores da resposta imune contra <i>Plasmodium</i> .....	33
2.6.	Proteína de Superfície do Merozoíto 1 .....	36
2.6.1.	Estrutura N-terminal PvMSP1	38
2.6.2.	Diversidade genética do Bloco 2 da MSP1	40
2.6.3.	Resposta humoral contra Bloco-2 de MSP1	41
3.	JUSTIFICATIVA	44
4.	OBJETIVO	45
4.1.	Objetivo geral .....	45
4.2.	Objetivos específicos .....	45
5.	METODOLOGIA	46
5.1.	Tipo de estudo, População de estudo e Aspectos éticos. ....	46
5.2.	Produção de Proteínas Recombinantes variantes do bloco 2 da PvMSP1 .....	47
5.2.1.	Transformação em Células competentes ( <i>E. coli</i> BL21)	49
5.2.2.	Cultivo e Indução das Proteínas Recombinante	50
5.2.3.	Análise da Expressão das Proteínas Recombinantes	51
5.2.4.	Purificação das Proteínas Recombinantes	52
5.2.5.	Quantificação das proteínas	53
5.2.6.	Antigenicidade das proteínas por <i>Western Blotting</i> (WB) .....	53

5.3. Imunoensaio por Elisa Indireto para avaliação da resposta humoral dos grupos estudados.....	54
5.4. Análises Dos Dados.....	55
6. RESULTADOS	57
6.1. Produção de proteínas recombinantes do bloco 2 da proteína-1 da superfície de merozoíto (MSP1) para avaliação da resposta humoral em indivíduos .....	57
6.2. Soroprevalência de IgG e subclasses contra variantes do bloco 2 da PvMSP1. ....	58
6.3. Sensibilidade e especificidade das proteínas variantes do bloco 2 da PvMSP1 .....	62
6.4. Níveis de IgG total e Subclasses (IgG1, IgG2 e IgG3) contra as proteínas variantes do bloco 2 de PvMSP1 em indivíduos residentes na comunidade Rio Pardo, agrupados em sintomáticos, assintomáticos e não-infectados com malária vivax. ....	66
6.5. Comparação dos níveis de anticorpos contra proteínas do bloco 2 da PvMSP1 .....	69
7. DISCUSSÃO	75
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	79
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	80

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa com grande impacto na saúde pública mundial. A última década testemunhou progressos consideráveis em relação à luta de controle da malária, com a redução da mortalidade evitável nos países de renda baixa e média, redução de 50% nas mortes infantis, redução de 25% nos casos de malária e a certificação de “país livre de malária” em mais cinco países nos últimos 5 anos (Paraguai, Argentina, Uzbekistan, Maldivas e Sri Lanka) (WHO, 2018). Esse progresso levou a um otimismo sobre a eliminação da malária. E com isso foi elaborada uma “Estratégia Técnica Global contra Malária com metas ambiciosas de reduzir a incidência de casos de malária e as taxas de mortalidade global em pelo menos 90% até 2030” (HEMINGWAY, 2016).

Tais metas parecem inatingíveis, visto que, somente no ano de 2017 foram estimados 219 milhões de casos de malária e 435 mil mortes em todo o mundo (WHO 2018), além disso, cerca de 3,2 bilhões de pessoas em 97 países e territórios que permanece em áreas de risco de infecção por malária (HEMINGWAY et al., 2016). No Brasil, houve um aumento nos casos de malária em 2017, interrompendo um período de seis anos de declínio dessa infecção. A maioria dos casos foram oriundos da Região Amazônica, com destaque para os estados do Pará, Amazonas e Roraima, que apresentaram um aumento de mais de 50% no número de casos, sendo *P. vivax* responsável por 88% das infecções no Brasil (SIVEP-MALARIA, 2017).

A infecção por *P. vivax* por muito tempo foi considerada a forma benigna da malária, no entanto, vários estudos vêm relatando complicações graves (PRICE, 2009; DOUGLAS, 2012; KUMAR; SARAVU, 2017; DAYANAND, 2019). Além disso, as estratégias de controle da malária vivax tiveram um sucesso limitado, quando comparado

a malária por *P. falciparum*, por diversas razões. 1) são confundidas pela falta de acesso a um diagnóstico fiável; 2) pela emergência de isolados resistentes a múltiplos fármacos; 3) pela capacidade do parasita de transmitir precocemente o curso da doença e, por último, 4) a recaída de fases hepáticas latentes a intervalos de tempo variáveis após a infecção inicial. O progresso na redução da malária vivax exigirá melhor acesso a um diagnóstico e um tratamento mais eficaz de parasitas latentes, além de uma caracterização mais detalhada sobre a epidemiologia e morbidade da malária. Sem estes, a malária vivax continuará sendo negligenciada (PRICE, 2007).

A relevância das infecções assintomáticas vem sendo cada vez mais reavaliada frente às iniciativas de eliminação da malária (BOUSEMA, 2014). Estima-se que até 80% das infecções são assintomáticas, e os testes atuais usados em pesquisa de campo não são sensíveis o suficiente, ou são muito dispendiosos para serem usados como estratégia contínua, para captar a baixa densidade de parasitas em áreas de baixa transmissão (HEMINGWAY, 2016). Como estratégia visando à eliminação da malária, a notificação e a investigação de casos sintomáticos e assintomáticos deve ser rápida e completa para identificar e prevenir infecções adicionais por malária, bem como reduzir a transmissão. Para isso, é necessário repensar o planejamento das buscas ativas ou passivas desses casos. Se por um lado a vigilância passiva com bom acesso aos serviços de saúde é adequada para identificação de casos sintomáticos em áreas com transmissão historicamente baixa, por outro lado, a detecção ativa de casos pode ser necessária para identificação de casos assintomáticos, que continuam transmitindo o parasita na ausência de sintomas.

É discutido se as infecções assintomáticas são inteiramente atribuídas à imunidade residual, segunda a qual é adquirida após exposição repetida à malária

(BOUSEMA, 2014). O desenvolvimento da imunidade clínica e parasitológica à malária é marcado pela capacidade de controlar doenças e a densidade parasitária. A proteção parece ser rapidamente adquirida e resulta em redução da mortalidade ou doença clínica grave, pelo menos de forma aguda. Em áreas de alta transmissão, a prevalência de parasitemia e o risco de morbidade e mortalidade causadas pela malária diminuem acentuadamente com a idade. Essa é a característica da “imunidade anti-doença”. Em contraste, a “imunidade antiparasitária” aparentemente adquirida lentamente confere proteção contra a parasitemia de alta densidade e o risco de doença grave. No entanto, essa imunidade esterilizante nunca é totalmente alcançada, tornando o portador assintomático. Esse fenômeno de alto grau de responsividade imune sugere que a imunidade antiparasitária é mediada pela presença dos parasitas e não somente como resultado de infecções prévias (DOOLAN, 2009).

Acredita-se que a razão da imunidade antiparasitária nunca ser totalmente alcançada, seja devido, aos mecanismos de evasão do parasita, polimorfismo genético e a variação antigênica. Estes mecanismos conferem uma vantagem significativa ao parasita porque o repertório de células e anticorpos antígeno-específicos não responde de forma eficaz numa próxima infecção com parasitas com diversidade genética distinta. A evidência emergente de respostas direcionadas a tais epítomos polimórficos e variantes implica que é improvável que o status imunológico seja definido por uma única resposta (MARSH; KINYANJUI, 2006). O desenvolvimento de vacinas continua sendo um objetivo na estratégia de controle e eliminação da malária. Dentre os antígenos propostos como candidatos vacinas, os antígenos de merozoíto são alvos promissores, haja visto sua eficácia parcial em ensaios clínicos (BEESON et al., 2016). No entanto, esses antígenos também podem servir como marcadores de imunidade (CUTTS et al., 2014). Dentre esses antígenos, as Proteínas de Superfície do Merozoíto (MSPs) são altamente complexos,

com papel fundamental no processo de invasão dos merozoítos nos eritrócitos e seu reconhecimento é bastante evidente na imunidade adquirida à malária (BEESON, 2016). Assim, as Proteínas de Superfície do Merozoíto vêm sendo apontada como candidato vacinal contra malária (VERSIANE et al., 2013b, BESSON et al., 2016).

A proteína-1 de superfície do merozoíto (MSP-1) é o antígeno mais abundante da superfície do merozoíto. Essa proteína é oriunda de um gene de cópia única e é expresso como precursor, sendo submetido a dois processamentos proteolíticos antes da invasão nos eritrócitos. Esses processamentos resultarão em quatro fragmentos polipeptídicos, um fragmento N-terminal de 83 kDa, dois fragmentos internos (30 e 38 kDa) e um fragmento C-terminal ancorado a GPI de 42 kDa (DAS et al., 2015). Baseado na diversidade genética, o gene *msp1* tem várias sequências conservadas dimórficas flanqueando os domínios polimórficos chamados blocos, e o Bloco 2, que está localizado no fragmento de 83 kDa, é conhecido como o bloco mais polimórfico (SOARES et al., 2014).

Estudos soropidemiológicos mostraram que anticorpos da subclasse IgG3 contra a região do Bloco 2 da PvMSP1, foram associados à proteção clínica da malária por *P. vivax* em indivíduos assintomáticos. No entanto, a soroprevalência de anticorpos contra essa região não mostrou uma cobertura de 100% de positividade entre os grupos de indivíduos assintomáticos (NOGUEIRA et al., 2006, VERSIANE et al., 2013a), sugerindo que a imunidade protetora está associada a habilidade de reconhecer um repertório de antígenos polimórficos e variantes (MARSH; KINYANJUI, 2006). Assim, o desenvolvimento do status imunológico dos assintomáticos é necessário a aquisição de um repertório de anticorpos contra variantes de um antígeno em questão. Por essa razão, nesse estudo um painel de variantes do Bloco 2 da PvMSP1 foi elaborado com proteínas

recombinantes, e a resposta IgG3 específica, associada a premunição à malária foi explorada para o desenvolvimento de uma ferramenta imunológica de identificação de assintomáticos. Assim, nossos achados revelaram que o painel de variantes Bloco 2 do PvMSP-1 e sorologia subclasses IgG específica pode guiar o uso racional como estratégia para eliminação da malária.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Epidemiologia da Malária

A malária é umas das infecções parasitárias mais frequentes no mundo, representando um sério problema de saúde pública mundial (WHO 208). É causada pelos protozoários do gênero *Plasmodium* spp. e transmitida pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*. Até o momento foram descritas cinco espécies de *Plasmodium* spp. que podem causar malária em humanos: o *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, e *P. knowlesi* (BRANDI, 2013). Dentre as espécies, o *P. vivax* e *P. falciparum* são as mais frequentes na malária humana. (HOWES et al., 2016, WHO, 2018).

Segundo a OMS, quase metade da população mundial residem em áreas de risco de transmissão (figura 1), sendo considerada endêmica em 91 países e territórios (WHO 2018). Ressalta-se que condições de pobreza e vulnerabilidade de pessoas que vivem em áreas de risco, com ambientes que favorecem a predominância do vetor de transmissão, contribuem para a prevalência dessa doença em determinadas regiões do mundo (WHO, 2018).

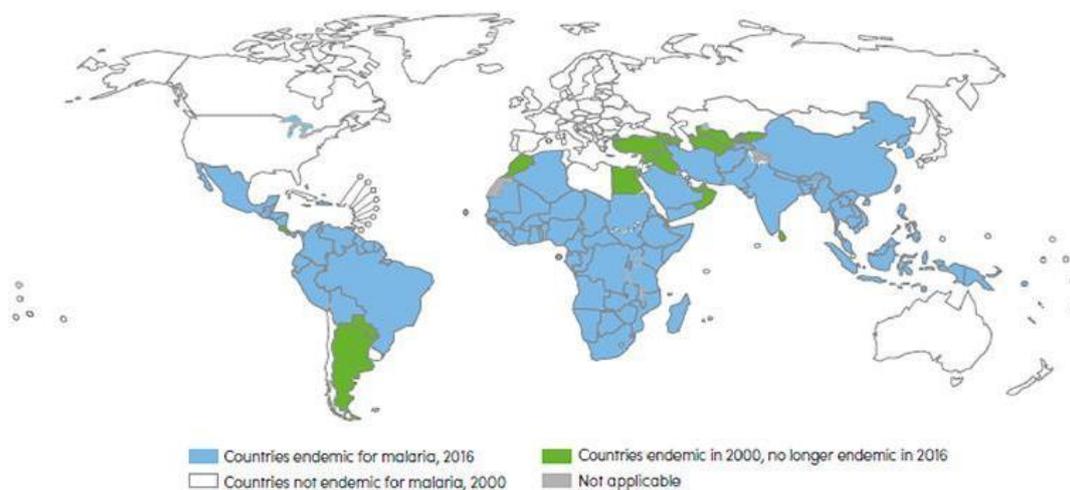


Figura 1 - Mapa das áreas de risco para Transmissão da Malária no Mundo. Fonte: WHO (2018).

Em relação aos números de casos de malária no mundo, segundo o Relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2017 foram estimados 219 milhões de casos, revelando um aumento quando comparados com os anos de 2016 e 2017, interrompendo um período de declínio no número de infecções por malária, como mostra a figura abaixo (figura 2) (WHO 2018). Quanto à letalidade das infecções por malária, 435 mil indivíduos foram a óbito (WHO, 2018). Sobrepõem-se que a maioria desses óbitos correspondem as infecções por *P. falciparum* ocorridas no continente africano, em crianças menores de 5 anos de idade (WHO, 2018).

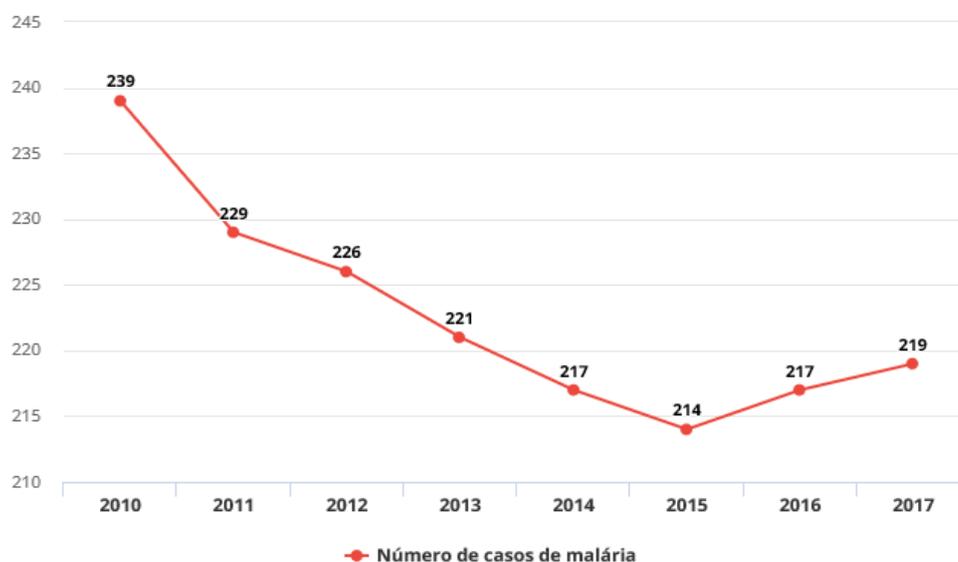


Figura 2 - Distribuição do número de casos de malária mundial, no período de 2010 a 2017 (Fonte: WHO 2018)

Nas regiões exo-africana, a malária acometida por *P. vivax* é amplamente distribuída, sendo frequente na Região da Ásia, da América e no Mediterrâneo Oriental (WHO, 2018). Na região das Américas, há uma nova alerta após o aumento no número de casos, segundo dados epidemiológicos da Organização Pan-Americana da Saúde, emitidos em 2018 (OPAS, 2018). Dentre os países que apresentaram esse aumento, Venezuela (53%) e Brasil (22%), se destacam por apresentar maior número de casos nessa

região (WHO, 2018). Com isso, o fortalecimento de ações de vigilância e controle da malária nessa região é necessário, para evitar o retrocesso nas medidas de controle e na meta de eliminação da doença (OPAS, 2018).

No Brasil, a malária concentra na região Amazônica, esta que apresenta características socioeconômicas e ambientais que contribuem para o desenvolvimento e proliferação do vetor transmissor (WHO 2018). Dentre as espécies, *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* são responsáveis pelas infecções de malária no Brasil, no entanto, *P. vivax* corresponde a 88% das infecções (OPAS 2018).

Para um controle melhor das infecções da malária no Brasil, o Sistema Informatizado de Vigilância Epidemiológica (Sivep-malária) juntamente com Secretaria de Vigilância à Saúde (SVS) criaram o mapa de risco do Brasil (figura 3), conforme o Índice Parasitário Anual (IPA) dos casos notificados de malária, que levam em consideração as características epidemiológicas do local e o risco de transmissão. O IPA é quantificado através do número de casos da doença por mil habitantes. Assim, o território brasileiro é classificado em 4 áreas de acordo com o IPA:

- Áreas de Alto Risco (IPA > 49,9 casos/1.000 habitantes): áreas de transmissão com alta densidade de vetores/anofelinos;
- Áreas de Médio Risco (IPA de 10 a 49,9 casos/1.000 habitantes): áreas caracterizadas pela menor densidade de vetores, com transmissão da doença em locais delimitados;
- Áreas de Baixo Risco (IPA de 0,1 a 9,9 casos/1.000 habitantes): locais com ocupações estáveis, com baixa transmissão da doença;
- Áreas Não-Endêmicas (IPA = zero): Locais onde não há transmissão da malária.

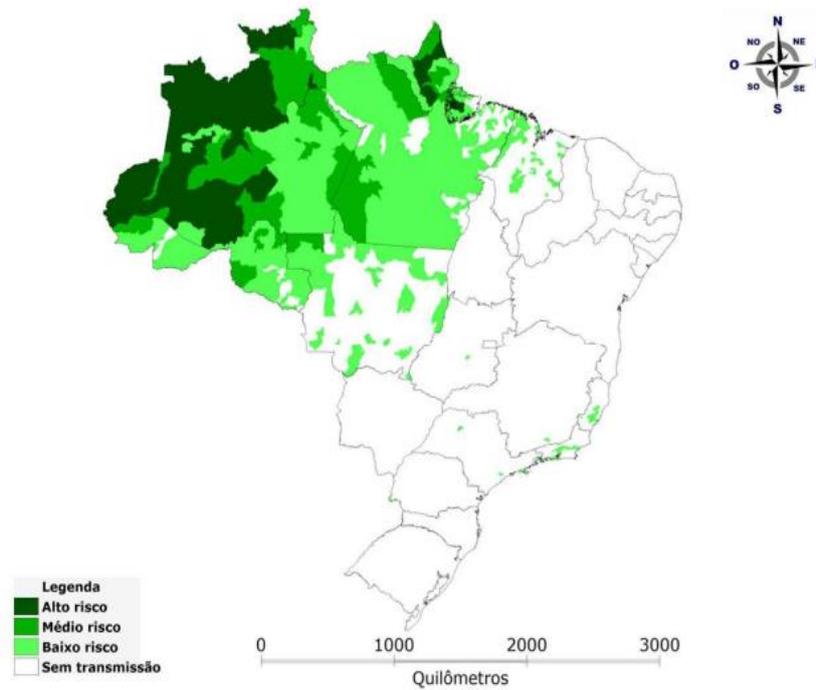


Figura 3 - Classificação das regiões endêmicas no território brasileiro conforme o IPA. (Fonte: Sivep-malária 2017)

Em 2017, o Brasil registrou 194 mil ocorrências, apresentando aumento de 50% do número de casos (figura 4), sendo os estados do Pará (153%), Amazonas (65%) e Roraima (56%), responsáveis por esse aumento. (SIVEP-MALARIA, 2018).

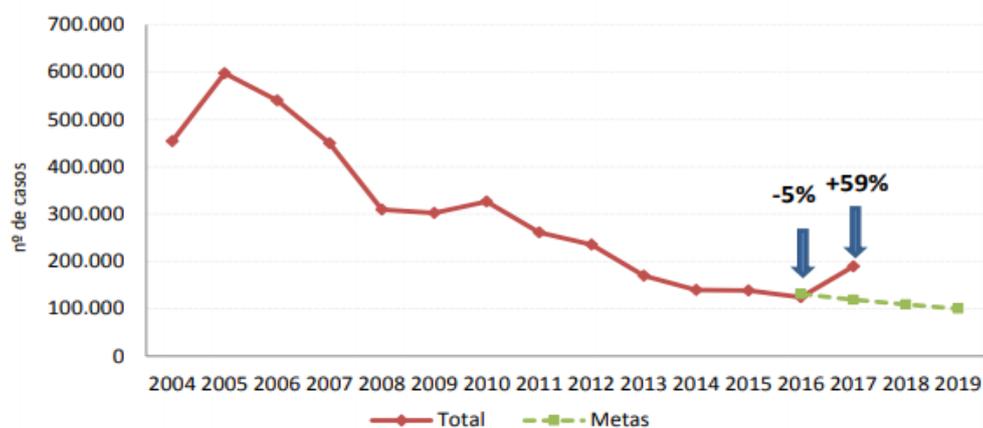


Figura 4 - Distribuição dos casos autóctones de Malária no Brasil, no período de 2004 a 2017 (Fonte: Sivep-malaria 2018)

O estado do Amazonas é considerado um dos mais endêmicos do Brasil, apresentando um IPA >40. E no primeiro semestre de 2018 registrou 46.900 ocorrências de malária, apresentando um declínio de 7,2% em comparação ao mesmo período de 2017. Dentre os municípios mais endêmicos para malária no Amazonas estão: São Gabriel da Cachoeira, Manaus, Barcelos, Tefé, Coari, Lábrea, Santa Isabel do Rio Negro, Guajará, Carauari, Atalaia do Norte, Tapauá, Jutaí, Presidente Figueiredo, Iranduba e Rio Preto da Eva (SIVEP-MALARIA, 2017).

## **2.2. Ciclo de vida do *Plasmodium* no hospedeiro vertebrados**

Os vetores transmissores da malária são da ordem Díptera, família Culicidae e gênero *Anopheles*. No Brasil, o principal anofelino transmissor é o *Anopheles darlingii* que apresenta ampla dispersão no território nacional, distribuindo-se por todo seu interior (LAPORTA et al., 2015; LOY et al., 2017). Em relação às duas espécies mais predominantes no Brasil, *P. vivax* e *P. falciparum*, às fontes de infecção para os mosquitos são as próprias pessoas doentes e até mesmo indivíduos assintomáticos que albergam formas sexuadas do *Plasmodium* (BOUSEMA, 2014).

Esse protozoário tem ciclo de vida complexo que envolve reprodução sexual no mosquito vetor e estágios assexuais no hospedeiro vertebrado (figura 5). Na malária humana, durante o repasto sanguíneo, o mosquito inocula na corrente sanguínea a forma infectante do parasita denominado esporozoíto, iniciando assim o estágio pré-eritrocítico. Estes esporozoítos migram para o fígado, invadem células hepáticas, onde desenvolverão e se multiplicarão por esquizogonia diferenciando-se em merozoítos hepáticos. Nesse processo, as células se rompem, liberando milhares de merozoítos na corrente sanguínea (MO, 2018).

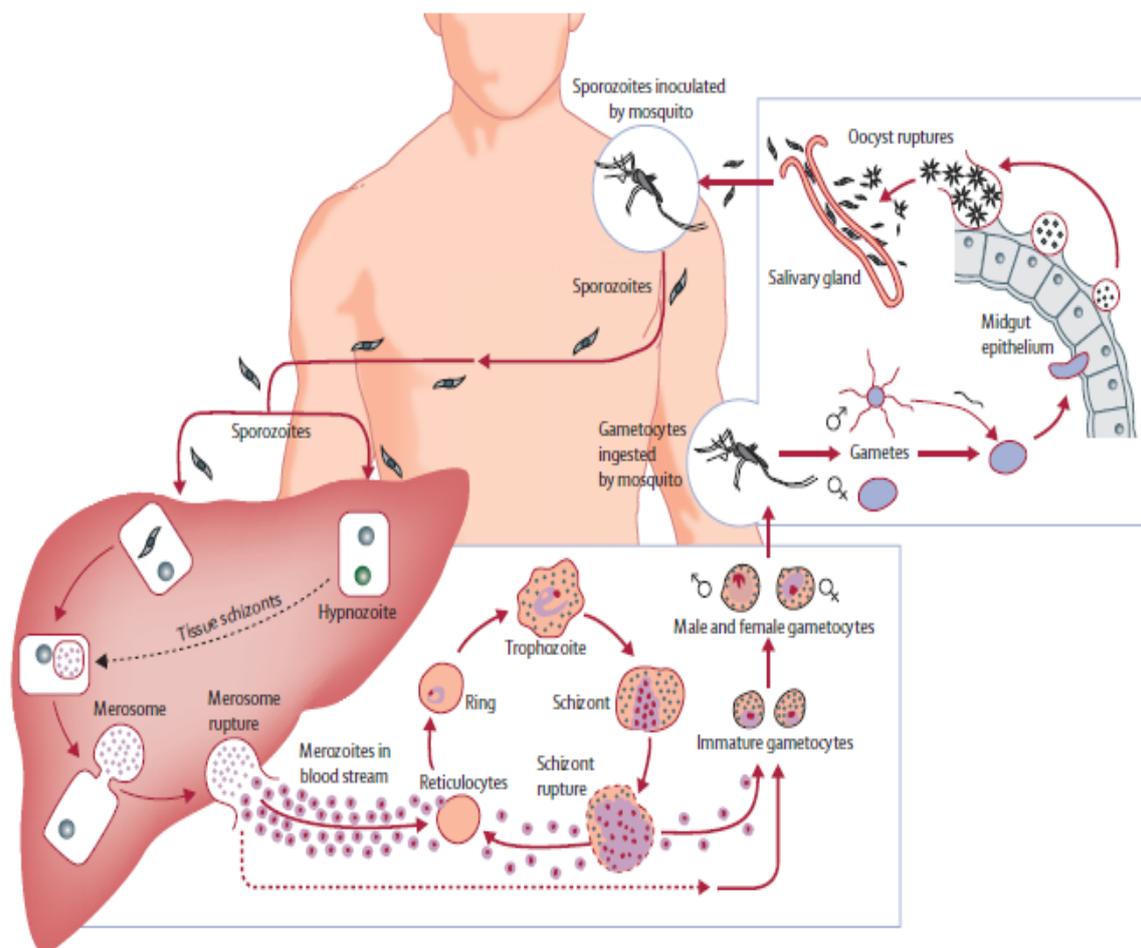


Figura 5 - - Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. (Fonte: Mueller et al., 2009).

Os merozoítos liberados na corrente sanguínea se ligam aos eritrócitos jovens para o processo de invasão. Neste momento inicia-se a segunda fase de reprodução assexuada dos plasmódios, denominada esquizogonia do ciclo eritrocítico. Nesse ciclo, moléculas da superfície de merozoítos interagem com outras moléculas da superfície dos eritrócitos e sinalizam para o início do processo de invasão. Esse processo requer a liberação de moléculas essenciais para organelas apicais do merozoíto, que irão iniciar a junção de actina e miosina em movimento que leva a internalização do parasita para interior do vacúolo parasitóforo que se forma na hemácia (COWMAN; BERRY; BAUM, 2012).

Esses trofozoítos crescem ao longo de aproximadamente 46-48hs, período em que o parasita passa por alterações morfológicas. Esse processo é iniciado com um trofozoíto jovem (caracterizado morfológicamente como um anel), seguida pela forma ameboide (trofozoíto maduro), e ao final se diferencia em esquizontes. Nesta etapa, os esquizontes adquirem pequenos núcleos que darão origem aos novos merozoítos, e ao final do processo, quando surgem de 12-16 merozoítos, estes irão romper a membrana do eritrócito liberando-os na circulação. É durante esse ciclo que aparece os sintomas clínicos da malária, sendo que ele se repete a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* ou *P. falciparum* e a cada 72 horas nas infecções por *P. malariae* (MUELLER et al., 2009).

Depois de algumas gerações de trofozoítos nas hemácias, alguns se diferenciam em formas sexuadas do parasito, denominados de gametócitos. Durante o repasto sanguíneo do mosquito transmissor, o mesmo pode ingerir hemácias contendo gametócitos que se diferenciaram em gametas masculinos (microgametas) e feminino (macrogametas), assim ocorrendo a fertilização no lúmen do estômago do mosquito com a formação do zigoto e posteriormente do oocineto, que passam pelo processo de esporogonia formando os oocistos, dando continuidade ao ciclo formando milhares de esporozoítos que migraram para as glândulas salivares dos mosquitos. Ao realizar os próximos repastos sanguíneos, a fêmea irá infectar outro hospedeiro vertebrado e desta maneira iniciará um novo ciclo (MUELLER et al., 2009).

No ciclo do *P. vivax*, assim como do *P. ovale*, pode haver a ocorrência de recaídas ou reaparecimento da parasitemia e sintomas de malária meses após o tratamento da doença. Este fato se deve pelo desenvolvimento e diferenciação em hipnozoítos, que são formas latentes do parasita que ficam presentes em células hepáticas até que sua divisão se inicie, gerando um novo quadro da doença (WHITE et al., 2015).

Essa característica é importante na biologia do *P. vivax* pois pode ocorrer nas semanas e nos meses que seguem uma parasitemia primária através do estágio hipnozoíta (BATTLE et al., 2014). No entanto, a ativação desses hipnozoítos ainda não foi esclarecida, o que dificulta as tomadas de medida de controle da malária pra *P. vivax* (OLLIARO et al., 2016). Visto que essa característica se apresenta como um desafio único para o controle da transmissão do *P. vivax*, não é apropriado supor que os métodos de controle desenvolvidos para a malária de *falciparum* seja diretamente transferível para malária por *P. vivax* (BATTLE et al., 2014).

O *P. vivax* também difere do *P. falciparum* em relação às características epidemiológicas e biológicas. Nas infecções acometidas pelo *P. vivax*, os gametócitos surgem na circulação antes da progressão de uma infecção primária ou de uma recrudescência (MENDIS et al., 2001; MCKENZIE et al., 2002). Essa gametocitose precoce pode ser transmitida ao vetor durante o repasto sanguíneo, antes do diagnóstico ou tratamento possam ocorrer (DOUGLAS et al., 2012).

### **2.3. Patogênese da malária**

A malária é uma doença caracterizada pela ocorrência de paroxismo acompanhado de febre alta, cefaleia intensa, mialgia, lombalgia e calafrios seguida de uma intensa sudorese (BRANDI, 2013). A patogênese da malária pode se apresentar de diferentes formas e isto se deve a diversos fatores como, diversidade genética do parasita, condições fisiológicas, aspecto nutricional do hospedeiro, idade, exposição prévia, entre outros. A combinação desses fatores pode resultar em casos sintomáticos ou assintomáticos em indivíduos imune, grave ou não-grave. (BOUSEMA, 2014)

A manifestação clínica da malária é caracterizada pelo aparecimento de febres altas, calafrios e tremores que podem ocorrer de forma cíclica, denominado paroxismo. Esse paroxismo pode ocorrer de 6 a 10 horas, passando por estágio de calafrio e tremores, seguido estágio com febre, dores de cabeça, e finalmente, um estágio de sudorese intensa e cansaço. A malária pode desenvolver formas clínicas graves, tais como prostração; alteração da consciência; dispneia ou hiperventilação; convulsões; hipotensão arterial ou choque totais (ANSTEY et al., 2009).

As manifestações clínicas em infecções causadas por *P. falciparum*, se não tratadas, podem evoluir levando a letalidade. Crianças com malária grave apresentam quadros de anemia aguda, icterícia, estresse respiratório devido a acidose metabólica e malária cerebral. Já a malária acometida pelo *P. vivax* invade preferencialmente os reticulócitos (eritrócitos jovens) contribuindo para cargas parasitárias mais baixas além de uma menor destruição de eritrócitos totais (ANSTEY et al., 2009).

#### **2.4. Tratamento e profilaxia**

A malária é uma doença tratável e quando o tratamento é administrado de maneira correta as chances de curas são elevadas. O objetivo primário do tratamento visa a eliminação completa do parasito da corrente sanguínea do indivíduo e a prevenção de complicações e mortes. De modo geral o tratamento depende da espécie de *Plasmodium* envolvida e da presença ou não de complicações (WHO, 2018).

Nos casos de malária não complicada causada por *P. falciparum* a recomendação da OMS é o uso de combinações terapêuticas à base de artemisinina (ACTs). O uso combinado de dois princípios ativos com mecanismos de ação diferentes faz das ACTs, hoje, o antimalárico mais eficaz disponível no mercado (WHO, 2018).

A malária causada por *P. knowlesi* segue o mesmo esquema de tratamento da malária causada por *P. falciparum*. Já para os casos de malária não complicada causadas por *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, a cloroquina ainda é o tratamento de primeira escolha, contudo, tem sido descrito algumas cepas de *P. vivax* resistente a cloroquina (ASHLEY; PHYO, 2018). O uso de primaquina via oral é recomendado associado a cloroquina nos casos de infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale* na intenção de prevenir as recaídas típicas destas espécies (WHO, 2018).

O tratamento dos casos de malária complicada é feito através da administração intramuscular ou intravenosa de artesunato injetável, seguido de um tratamento à base de ACTs assim que o paciente estiver apto a tomar medicamento via oral (WHO, 2015).

As estratégias para a erradicação e controle da malária geralmente estão focadas na prevenção por meio do controle de vetores ou na proteção de grupos de alto risco, como por exemplo, mulheres durante o período gestacional e crianças menores de 5 anos de idade (HEMINGWAY et al., 2016).

A maioria dos programas nacionais de prevenção da malária utilizam campanhas de distribuição em massa de redes mosquiteiras tratadas com inseticida (ITNs, do inglês “*Insecticide-treated mosquito nets*”). Nos últimos quinze anos mais de 660 mil casos de malária foram evitados na África subsaariana e cerca de 73% destes casos foram atribuídos a destruição de ITNs (WHO, 2015). A borrifação intradomiciliar com inseticidas com efeito residual (IRS, do inglês “*Indoor residual spraying*”) foi a principal estratégia da campanha global de erradicação da malária que resultou na eliminação da malária em muitos países e na redução em outros (WHO, 2015).

## 2.5. Mecanismos efetores da resposta imune contra *Plasmodium*

Os mecanismos efetores contra o *Plasmodium* dependem dos aspectos fisiológicos e genéticos do hospedeiro, que em determinadas situações podem impedir o desenvolvimento do ciclo do parasita e seus efeitos patogênicos ou podem facilitar o desenvolvimento do parasita, acarretando uma alta parasitemia e o agravamento da doença. Esses mecanismos envolve a cooperação entre a resposta celular e humoral. Sabe-se que a exposição constante do indivíduo promove a imunidade clínica, tornando-o assintomático (PERSSON, 2010).

A resposta celular atua tanto na fase inicial da infecção quanto na fase tardia da malária. Na fase pré-eritrocítica, os esporozoítos são reconhecidos pelas células dendríticas imaturas e são drenados para os linfonodos, onde serão reconhecidos pelas células dendríticas maduras, processados e transportados para a superfície da célula, sendo apresentados aos linfócitos T *helper* (*naive*), através da ligação do antígeno leucocitário de classe II (HLA II). Simultaneamente, as células dendríticas mielóides produzem IL-12, modulando uma resposta imune celular para Th1. Estas, por sua vez secretam IL-2 e IFN- $\gamma$ , os quais induzem a ativação e proliferação de linfócitos T citotóxicos (CTLs) parasita-específico (GOOD; DOOLAN, 2010; SCHWENK; RICHIE, 2011; WILSON, 2016).

Os esporozoítos que migraram para o fígado através das células de Kupffer (KC) irão invadir vários hepatócitos (TAVARES et al., 2013). Os CTLs ativados entram na circulação e migram para o fígado, onde irão reconhecer o antígeno do parasita na superfície do hepatócito infectado, através do antígeno leucocitário de classe I (HLA-I) e induzem a produção de perforinas, granzimas e IFN- $\gamma$  para destruir as células infectadas (GOOD; DOOLAN, 2010). Os linfócitos TCD8<sup>+</sup> são considerados importantes efetores

na infecção a malária na fase pré-eritrocítica. Uma vez que essas células ativadas exibem ação citotóxica agindo na destruição de células hepáticas infectadas (TAVARES et al., 2013).

Os hepatócitos infectados se rompem, liberando milhares de merozoítos na circulação, dando início ao estágio eritrocítico. É nesse estágio que temos o aparecimento dos sintomas clínicos da malária e os antígenos produzidos são considerados potentes candidatos vacinais devido a sua alta imunogenicidade. De um modo geral o que se observa é que a imunidade à infecção do *Plasmodium* sp. no estágio sanguíneo é dependente de IFN- $\gamma$  e requer a cooperação das células dendríticas, células NK, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos B (McCALL; SAUERWEIN, 2010).

Na malária o IFN- $\gamma$  exerce várias funções, atuando como um indutor e um efector na resposta imune durante todo o ciclo de vida do parasita. TNF- $\alpha$  atua na ativação de macrófagos que fagocitam eritrócitos parasitados e merozoítos livres (OMER et al., 2003; STEVENSON; RILEY, 2004), e o IFN- $\gamma$  produzido por células NK na presença de IL-12 induz a diferenciação de linfócitos Th1, a maturação de células dendríticas, a expansão clonal de células T CD4<sup>+</sup> naive. As Células T CD4<sup>+</sup> perfil Th1 produz IL-2, que ativam mais células NK a secretarem IFN- $\gamma$ , o qual induz a maturação das células dendríticas e ativação de macrófagos (GOOD; DOOLAN, 2010).

A regulação da resposta imune a malária é caracterizada na presença de citocinas como TGF- $\beta$  e a IL-10 que podem atuar como inibidores dos efeitos patológicos da infecção associados a quadros graves da doença, como a malária cerebral e anemia grave (OMER et al., 2003; YAZDANI et al., 2006).

A imunidade celular no ciclo eritrocítico é menos evidente em relação pré-eritrocítico em razão das hemácias não expressarem moléculas do HLA de classe I e II. Por outro lado, a resposta imune humoral é essencial contra o estágio eritrocítico (LANGHORNE et al., 2008). Para isso, evidências apontam a importância da interação de células  $CD4^+Th1$  com as células B para produção de anticorpos específicos na eliminação eficiente do parasita durante a infecção na fase tardia (LI; HANSEM, 2019).

A importância dos anticorpos na proteção contra malária já foi bem descrita por estudos que demonstraram que a transferência passiva de imunoglobulinas de pacientes previamente infectados é capaz de diminuir a parasitemia em indivíduos não infectados. Os mecanismos efetores dos anticorpos são essenciais para eliminação da infecção, promovendo a neutralização dos merozoítos para fagocitose, lise mediada pelo sistema complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) para eliminação das células infectadas (TEO et al., 2015).

O controle da infecção no paciente está ligado também a subclasse de anticorpos produzida (figura 6). Os anticorpos citofílicos IgG1 e IgG3 podem se ligar aos antígenos de superfície dos eritrócitos (opsonização) e auxiliar na fagocitose ou participar da inibição celular dependente de anticorpos (ADCI) ou ainda participar da citotoxicidade dependente de anticorpos (ACCD). O efeito neutralizante da ADCI é mediado principalmente produção por óxido nítrico liberado por monócitos. Essas subclasses são associadas a menor parasitemia e redução do risco de patologia grave (STEVENSON et al., 2011).

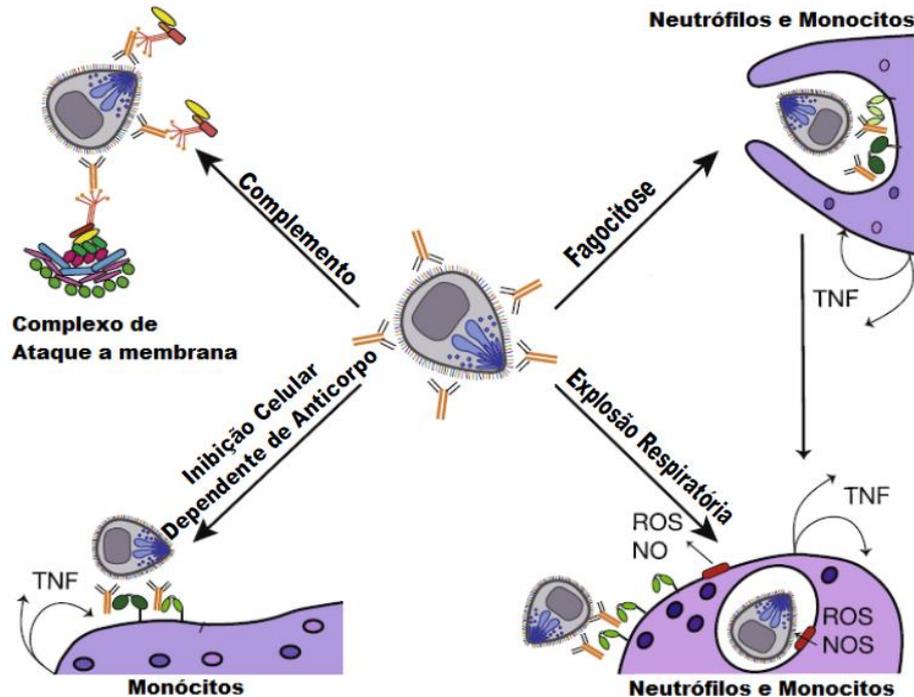


Figura 6 - Mecanismos efetores dos anticorpos contra merozoíto (STEVENSON et al., 2011)

Já os anticorpos não citofílicos IgG2 e IgG4 podem inibir as respostas efetoras dos anticorpos citofílicos pela competição dos mesmos domínios desencadeando um desequilíbrio na resposta imune a malária. Informações importantes sobre a função da resposta imune humoral em humanos referente ao estágio sanguíneo do parasita foram fornecidas por meio de estudos longitudinais em populações endêmicas (SABCHAREON et al., 1991; PIERCE, 2009; CROMPTON et al., 2010). Tais estudos analisaram a resposta dos pacientes a várias proteínas do ciclo eritrocítico do parasita, dentre elas as de superfície do parasita, como a proteína 1 de Superfície do merozoíto (MSP1), a qual é alvo deste estudo.

## 2.6. Proteína de Superfície do Merozoíto 1

A proteína MSP-1 é a proteína mais abundante de todas as proteínas de superfície ancoradas em GPI em termos de número de cópia (BESSON et al., 2016). Esta proteína é sintetizada na fase de esquizogonia do parasita e apresenta alto peso molecular variando

de 190-230 kDa. Essa proteína participa do processo de invasão dos merozoítos aos eritrócitos. Durante a interação, a MSP-1 se associa com às proteínas MSP-6 e MSP-7 formando um complexo. Esse complexo se liga a superfície do merozoíto pela âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) iniciando o processo de invasão (figura 7). Estudos com nocaute gênico mostraram que o gene MSP1 de *P. falciparum* é essencial para a invasão e sobrevivência do parasita, e que esse complexo sofre duas clivagens (DAS et al., 2015).

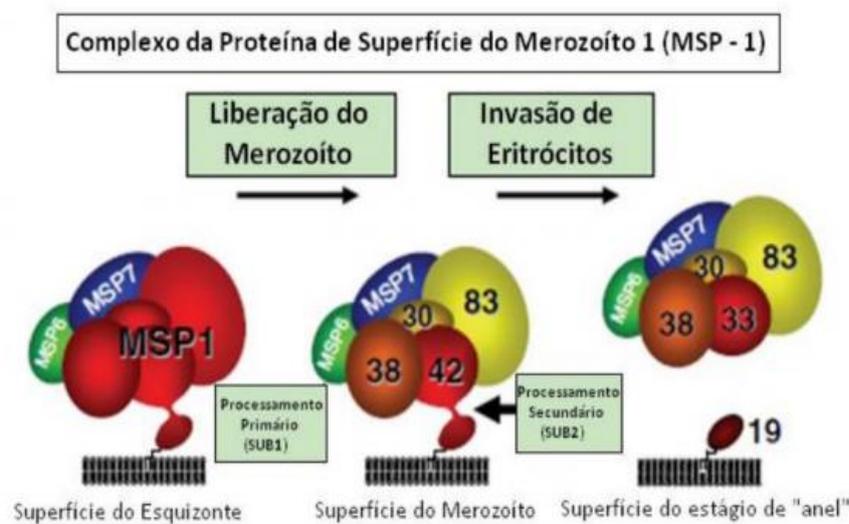


Figura 7 - Etapa de processamento e clivagem da MSP1 durante o processo de invasão do merozoíto no eritrócito (DAS et al., 2015)

A primeira clivagem é realizada pela protease subtilisina-like (SUB1) que gera 4 fragmentos de aproximadamente 83, 30, 38 e 42 kDa, conhecidos como: MSP1<sub>83</sub>, MSP1<sub>30</sub>, MSP1<sub>38</sub> e MSP1<sub>42</sub>. Na segunda clivagem, que acontece antes do merozoíto invadir o eritrócito, o fragmento de (42kDa) que permanece associado à superfície do merozoíto é clivado por outra protease a subtilisina (SUB2), gerando os fragmentos de 33 e 19 kDa (MSP-1<sub>33</sub> e MSP-1<sub>19</sub>). O fragmento maior de 33 kDa é liberado na corrente sanguínea com o restante do complexo, e o fragmento menor, 19 kDa, permanece ancorado à membrana do merozoíto pela GPI (BOYLE et al., 2014).

A MSP-1 possui regiões distintas, onde a região C-terminal é caracterizada como conservada enquanto a região N-terminal é polimórfica. Em relação a sua região C-terminal (MSP1-19), estudos *in vitro* mostraram que anticorpos específicos inibem a invasão de merozoítos de *P. yoeli* e *P. falciparum* (CHANG et al., 1992; CHAPPEL; HOLDER, 1993; SOARES et al., 1997). Até hoje não se sabe a função desta região, no entanto, um estudo descrevendo um gene parálogo do *pvmSP1* (denominado *pvmSP1p*) indicou uma proteína muito semelhante ao domínio C-terminal da proteína Pv-MSP1 tinha atividade de ligação nos eritrócitos (CHENG et al., 2013). Esta foi a primeira evidência de um possível papel da região C-terminal do MSP1 que, segundo estes autores, poderia indicar uma via alternativa na invasão de *P. vivax*.

### **2.6.1. Estrutura N-terminal PvMSP1**

A estrutura molecular da proteína MSP-1 foi descrita pela primeira vez por Tanabe e colaboradores (1987) no *P. falciparum* que classificou as regiões dos genes que a codifica, quanto a sua diversidade genética, resultando em 17 blocos, distribuídos em conservados, semi-conservados e polimórficos. No *P. vivax*, a proteína MSP-1 é composta por 1726 aminoácidos, e identificada a presença de dois alelos: Belém (DEL PORTILLO et al., 1991) e Salvador (GIBSON et al., 1992).

Considerando a PvMSP-1, um estudo de comparação de sequências do MSP-1 de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. yoelli* observaram semelhanças entre as sequências de aminoácidos nas três espécies, possibilitando assim a classificação dessa proteína em regiões conservadas, denominadas de blocos conservados interespecies (ICBs) (ICB1, ICB2, ICB4, ICB5, ICB6, ICB8 e ICB10); e três regiões conservadas apenas em *P. vivax* e *P. falciparum*, chamados de blocos conservados CBs (CB3, CB7 e CB9) (DEL PORTILLO et al., 1991).

A estrutura primária do PvMSP1 (200 kDa) é representada de acordo com estudos comparativos de sequências de *Plasmodium vivax* (DEL PORTILLO et al., 1991; PUTAPORNTIP et al., 2002). O mais aceito atualmente define que *pvmSP1* é composto de 13 blocos, sendo sete blocos conservados (blocos 1,3,5,7,9,11 e 13) ladeado por seis blocos de variáveis chamadas blocos polimórficos (2,4,6,8,10 e 12) (figura 8) (PUTAPORNTIP et al., 2002).

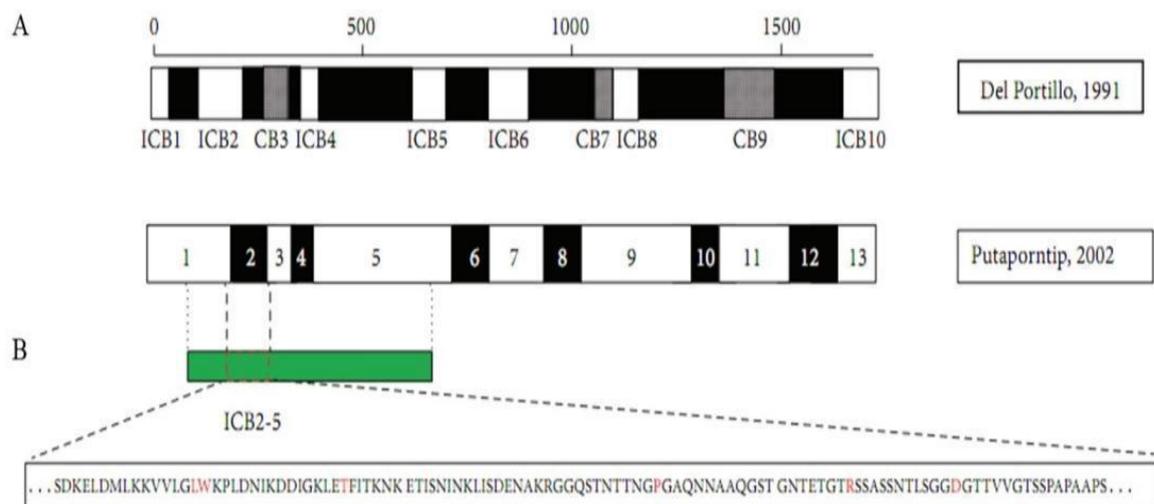


Figura 8 - Esquema da estrutura da Proteína-1 de Superfície de Merozoito (MSP1).

A – Em branco, blocos conservados interespécies entre *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* e *P. yoelii*, em cinza, blocos conservados entre *P. falciparum* e *P. vivax*. Em preto, representando os blocos polimórficos (fonte: DEL POSTILLO et al., 1991)

B – Esquema mostrando a divisão da MSP-1 em treze blocos, setes blocos conservados (branco) e seis polimórficos (preto). Fonte (PUTAPORNTIP et al., 2002)

Dentre esses blocos, o que mais se destaca é o bloco 2 da Proteína-1 de superfície de Merozoito, presente na região N-terminal da MSP-1, sendo o mais polimórfico. e vem sendo bastante estudado e associado com a imunidade do hospedeiro a malária (PUTAPORNTIP et al., 2002). Está bem estabelecido que a reatividade dos anticorpos anti-Nter-PvMSP1 é direcionada ao domínio polimórfico da proteína Nter-PvMSP1 (SOARES et al., 1997, 1999; NOGUEIRA et al., 2006; BASTOS et al., 2007; VERSIANI et al., 2013b).

### 2.6.2. Diversidade genética do Bloco 2 da MSP1

Vale ressaltar que o gene *pvmsp1* é de cópia única em cada cepa, assim, o domínio Bloco 2 varia de cepa para cepa de *P. vivax*, de forma que para ser uma boa subunidade vacinal deveria ser composta por um repertório de variantes deste Bloco 2. O antígeno MSP-1 apresenta extensa diversidade alélica entre isolados de várias espécies de *Plasmodium*, e é com o gene do *P. falciparum* que essa diversidade foi bem caracterizada (MILLER et al., 1993). Basicamente, a variação é dimórfica e o mecanismo principal para a variação alélica ocorre por meiose no mosquito por recombinação intragênica confinados principalmente nas regiões 5' e 3' do gene gerando novos alelos (melhor definidos como haplótipos) na progênie (TANABE et al., 1987). A utilização da região do bloco 2 do MSP-1 como marcadores genéticos permitiu observar variações substanciais na prevalência destes haplótipos durante diferentes períodos de um estudo sobre a dinâmica das populações de *P. falciparum* (BARTHI et al., 2012).

Em relação ao MSP-1 do *P. vivax* (PvMSP1), padrões semelhantes sugerem recombinação alélica ao do seu ortólogo. A diversidade genética dos haplótipos de bloco 2 variáveis mostram também extensas variações de sequência consistindo em várias substituições, inserções ou deleções e números variáveis de repetições em tandem curtas. O bloco 2 contém variabilidade entre as quais várias repetições em tandem são mais representativas da sua diversidade (PUTAPORNTIP et al., 2002).

Devido sua alta diversidade, o Bloco-2 de PvMSP1 parece ser um bom alvo para estudos de sua diversidade genética como o seu ortólogo (SOARES et al., 2014; PUTAPORNTIP et al., 2002; BASTOS et al., 2007; JONGWUTIWES, 2010).

A genotipagem realizada por nosso grupo por meio do sequenciamento de pequenas bibliotecas genicas revelou infecções simultâneas nos pacientes com malária vivax. (SOARES et al., 2014). Baseado no polimorfismo de único nucleotídico (SNP) na região do Bloco 2 de PvMSP1, o estudo revelou ainda que as substituições não sinônimas ocorreram preferencialmente nas regiões ricas de repetição (repeats) preditos como epítomos de células-B. Após o sequenciamento do Bloco 2 foram encontradas sete variantes distintas foram identificadas circulando na área endêmica de Manaus (figura 9).

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
	DENAKRGGQSTNTTNGTGAQTDGHQPTTASSETS·SGSSVSSVS·GSSGSG·SSGTG·STGNGSSSQARADSSSTNANYE									
H.1	DENAKRGSQSTNTTNGTGAQNNAAGSTGNTETG·TQSSASSNT·LSG·GAG·TTVVGTSPPAAPSTNANYE									
H.2	DENAKRGGQSI STI SGNGAQT DGHQPTT ASSETS·SGSSVSSVS·GSSGLG·SSGTG·STGNRSPSQAPAAPSTNANYE									
H.4	DENAKRGGQSTNTTNGTGAQTDGHQPTTASSETS·SGSSVSSVS·GSSGLG·SSGTG·STGNI SPSQARADSPSTGTDYN									
H.6	DENAKRGGQSTNTTNGTGAQTDGHQPTTASSETS·SGSSVSSVS·GSSGLG·SSGTG·STGNI SPSQARADSPSTGTDYN									
H.5	EEHKKRGGQYTSI SGNGAQT DGHQTT ASSETS·SGSSVSSVS·GSSNSG·SSGTG·STGNRSSQARADSRSTDTYN									
H.3	AENKKRSGHPTTTTNGAGTQPANGSI AAASSETTQI SGSSNSGSTGHGSSNSG·SSGTG·STGNGQSPATADASSTNANYE									
H.7	AENKKRSGHPTTTTNGAGTQPANGSFAAASSETTQI SGSSNSGSTGHGSSNSGSTGHGSSNSGSSGTG·STGNGQSPATADASSTNANYE									

Figura 9 - Sequência dos haplótipos circulantes na Região de Manaus. Fonte: Soares (2014).

### 2.6.3. Resposta humoral contra Bloco-2 de MSP1

Embora a maioria dos estudos soroepidemiológicos e de imunização experimental aponte a região C-terminal da MSP-1 como um importante alvo da resposta imune contra os *Plasmodium*, alguns trabalhos sugerem que as regiões polimórficas desta molécula representam candidatos potenciais para inclusão em uma vacina de subunidades (CONWAY et al., 2000). A suposição que a imunidade protetora é direcionada predominantemente para regiões altamente polimórficas da MSP1 foi recentemente suportada por experimentos realizados com plasmódios de roedores onde foi demonstrado que os domínios variáveis são selecionados, de uma maneira variante específica, nos camundongos previamente imunizados com parasitos apresentando variantes heterólogas

da MSP1 (MARTINELLI et al., 2005). Estudos com a MSP-1 de *P. falciparum* demonstraram que o perfil de anticorpos IgG específicos para antígenos representando o bloco 2 polimórfico foi claramente associado à proteção clínica ou a um reduzido risco de infecção em indivíduos africanos adultos residentes em áreas de intensa transmissão de malária (CONWAY et al., 2000; JOUIN et al., 2001).

Os anticorpos naturalmente adquiridos reconhecem com mais frequência antígenos que compunham os blocos variáveis quando comparados a antígenos que representam blocos conservados. O bloco 2 é o principal alvo de estudo da região variável da MSP1, associado a imunidade clínica contra a malária em *P. falciparum* (CONWAY et al., 2000; POLLEY et al., 2003; SOWA et al., 2001; CAVANAGH et al., 2004; GALAMO et al., 2009; NORANATE et al., 2009; BHARTI et al., 2012).

Uma investigação sobre a presença de anticorpos contra MSP1 em indivíduos expostos ao *P. vivax*, usando proteínas recombinantes compreendendo os blocos polimórficos 2 e 4 e três blocos conservados localizados na região N-terminal da PvMSP-1 (ICB2-5) foi associada com reduzido risco de infecção e proteção clínica (NOGUEIRA et al., 2006). Outro estudo realizado por Fernandez-Becerra e colaboradores (2010) demonstraram diferenças no perfil de subclasses de IgG específicas para proteínas recombinantes correspondentes às regiões N- e C-terminais da PvMSP1 entre indivíduos expostos ao *P. vivax* em regiões endêmicas de Papua Nova Guiné (PNG) e Brasil. Os autores observaram que as crianças de PNG apresentavam predominantemente respostas de IgG1 contra a região C-terminal da PvMSP-1, enquanto os adultos no Brasil apresentaram predomínio de respostas de anticorpos IgG3 para ambas as regiões da proteína. Bastos e colaboradores avaliando a resposta de anticorpos naturalmente adquirida contra um painel de recombinantes representando diferentes variantes dos

domínios polimórficos da PvMSP-1 encontrados entre os parasitos locais, verificaram associação entre exposição cumulativa à malária e níveis de anticorpos específicos para domínios polimórficos (BASTOS et al., 2007). Estes autores sugerem que a resposta de anticorpos contra um repertório de variantes dos domínios polimórficos da PvMSP-1, aos quais os indivíduos estão continuamente expostos, são obtidas somente após várias infecções repetidas e podem requerer frequente boosting (BASTOS et al., 2007).

### 3. JUSTIFICATIVA

As estratégias atuais de controle da doença não têm sido eficientes, pois não eliminam a malária residual em áreas onde residem os indivíduos assintomáticos. Os portadores assintomáticos representam um importante reservatório de parasitas e que eles podem contribuir para manter altos os níveis de transmissão. Segundo a Estratégia Técnica Global contra Malária, uma das medidas desse programa de controle é a caracterização do papel de portadores assintomáticos na transmissão da malária.

Em áreas endêmicas de malária vivax, como a comunidade Rio Pardo, os residentes são expostos cotidianamente à infecção por *P. vivax*. Essa exposição contribui para um perfil de anticorpos específicos e conseqüentemente a proteção clínica da malária, gerando indivíduos assintomáticos. Nossos estudos preliminares mostraram que os indivíduos assintomáticos apresentavam maiores níveis de anticorpos IgG3 contra Nterm-PvMSP1 apesar da soroprevalência não ser total devido à região do antígeno ser altamente polimórfico. Como solução deste problema foram desenhadas e produzidas cinco proteínas recombinantes baseadas nas sequências dos sete haplótipos circulantes na região, descritos anteriormente. Esse estudo acredita que a combinação desse painel de variantes do Bloco 2 da Pv-MSP1 e a análise da resposta IgG3 possa ser uma ferramenta ao programa de eliminação e erradicação da malária.

## **4. OBJETIVO**

### **4.1. Objetivo geral**

Caracterizar a resposta IgG3 contra o painel de proteínas variantes do Bloco 2 da MSP1 como método de identificação de indivíduos assintomáticos a malária pelo *P. vivax*.

### **4.2. Objetivos específicos**

1. Produzir proteínas recombinantes representativas das variações da região do bloco 2 da PvMSP1;
2. Comparar os níveis de IgG e suas subclasses em soros de indivíduos sintomáticos, assintomáticos e não infectados por *Plasmodium vivax*;
3. Averiguar a sobrevivência de IgG e Subclasse anti-variantes do bloco 2 da PvMSP1 e sua associação com a proteção clínica da malária;
4. Avaliar a sensibilidade e especificidade das proteínas recombinantes variantes do PvMSP1.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Tipo de estudo, População de estudo e Aspectos éticos.

Para o presente estudo, foi utilizado uma soroteca armazenada em Biobanco do Laboratório Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazonia (DCDIA-FIOCRUZ/AM). Esta soroteca continha 114 soros provenientes de um estudo transversal aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (Aprovação Ética nº 3640.0.000.115-07), no qual participaram residentes da comunidade de Rio Pardo localizada no município de Presidente Figueiredo, Amazonas.

Em síntese, nesse estudo transversal, amostras sanguíneas foram coletadas para determinação de infecção por malária por meio de gota espessa corada com Giemsa (M) e PCR em tempo real (PCR), realizado por *nested* PCR, baseado no gene rRNA para identificar infecções por *P. vivax*. Os residentes foram agrupados (figura 10) em três grupos, sendo eles:

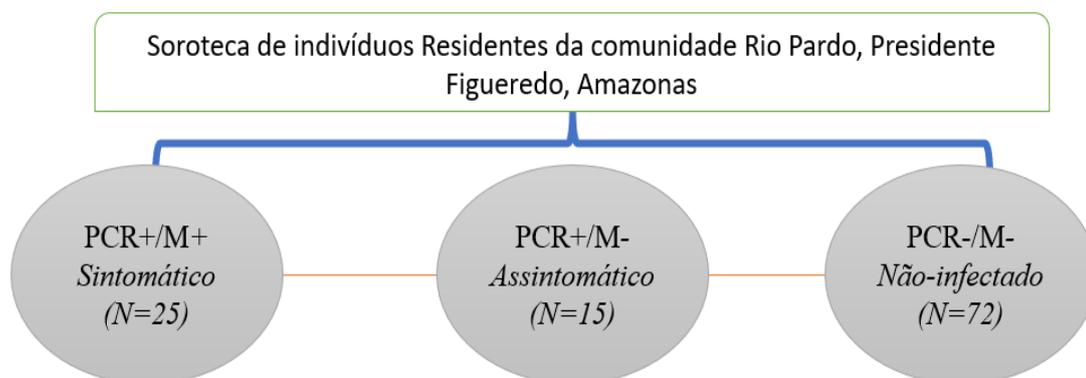


Figura 10 - Agrupamento dos soros de indivíduos residentes na comunidade Rio Pardo, região endêmica para malária no Amazonas, que foram analisados no presente estudo de soro prevalência.

- PCR+/M+ (sintomático): composto de indivíduos positivos em ambos os testes (PCR e gota espessa) que apresentou sintomas de malária aguda nos dois meses de acompanhamento.
- PCR+/M- (assintomático): PCR positivo, pois foi positivo no PCR para malária mista ou por *P. vivax*, e, M negativo, indicando que o indivíduo não apresentou sintomas clínicos de malária durante os dois meses de acompanhamento.
- PCR-/M- (não-infectado): residentes da área estudada, mas que no momento do corte transversal e no seguimento de dois meses foram negativos nos dois testes e não tiveram sintomas de malária.

## **5.2. Produção de Proteínas Recombinantes variantes do bloco 2 da**

### **PvMSP1**

Para realização do estudo sorológico, foram produzidas cinco proteínas recombinantes variantes da região polimórfica do bloco 2 da PvMSP1. Essas proteínas foram desenhadas a partir do alinhamento das sequências da proteína 1 de superfície de merozoíto (MSP1) dispostas no GenBank. Várias repetições aleatórias a montante e a jusante de sequências semi-conservadas ajudaram na construção de mosaicos, e as repetições que distinguiram cinco famílias principais de alelos variantes (figura 11). O mosaico foi desenhado usando cores diferentes para as sequências conservadas, híbridas e repetidas, para facilitar a compreensão da diversidade.



Figura 11 - Mosaico da diversidade do Bloco-2 da PvMSP1

Sequências obtidas a partir das bases de dados do GenBank contendo repetições aleatórias flanqueantes híbridas (região semi-conservadas). A região conservada está representada na cor amarela, enquanto a região polimórfica é representada por várias cores, dependendo da sequência, sendo que cada cor representa uma variação

A construção do mosaico possibilitou desenhar um painel de cinco genes sintéticos representando as variantes alélicas em plasmídeos pSMART e sintetizados pela IDT, (Integrated DNA Technologies) (figura 12). Cada sequência foi digerida com enzimas de restrição apropriadas (InvitrogenTM) e os fragmentos foram purificados (QIAquick Gel Extraction Kit - Qiagen) e inseridos em plasmídeos pRSET (InvitrogenTM) utilizando o protocolo do fabricante (InvitrogenTM) para o processo de transformação bacteriana.

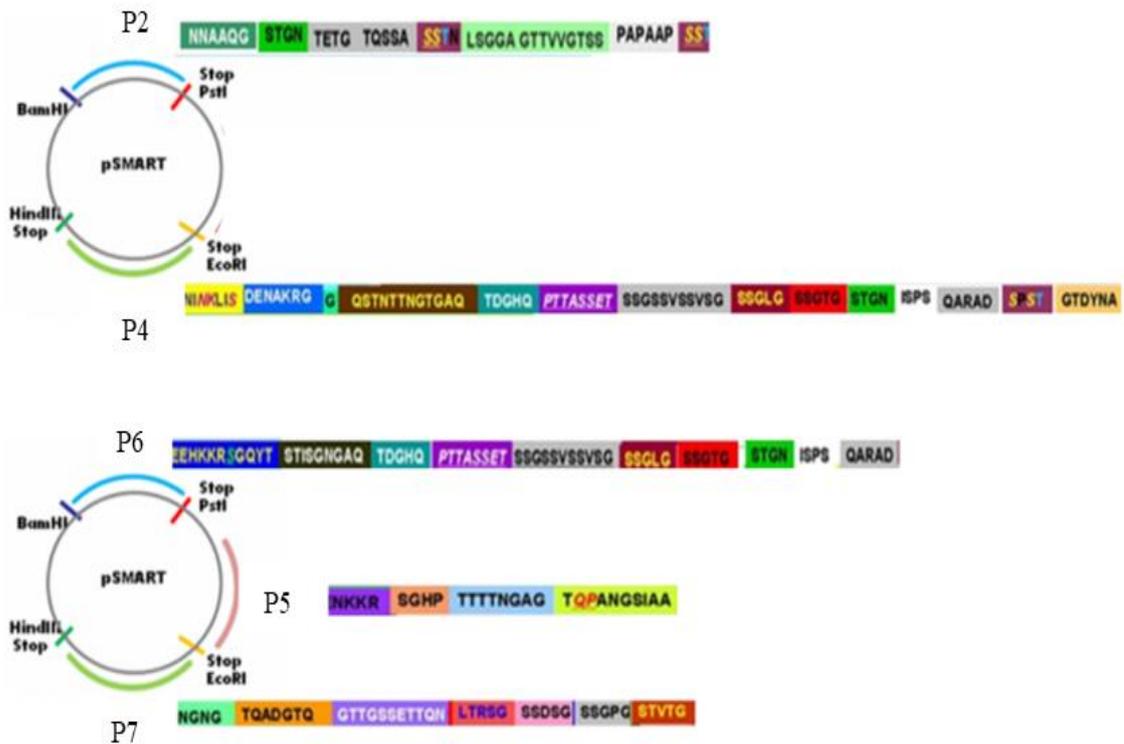


Figura 12 - Representação esquemática do mapa físico do vetor de expressão pSMART com os genes das proteínas P2, P4, P5, P6 e P7, variantes do bloco 2 da proteína-1 de superfície de merozoíto (PvMSP1).

### 5.2.1. Transformação em Células competentes (*E. coli* BL21)

Para o processo de transformação, obteve-se os plasmídeos com o inserto da sequência de cada proteína (P2, P4, P5, P6, P7), desenhados e confirmado em estudos anteriores. Dessa forma, utilizou-se 1ul de cada plasmídeo, adicionando-os em 50ul de célula bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, célula competente usada para transformação desses antígenos heterólogos. Em seguida, transferimos a mistura (plasmídeos e células competentes) para uma cubeta previamente resfriada e levamos ao eletroporador (modelo ECM 399, BTX®), aplicando dois pulsos seguidos de 1900V.

Após a eletroporação, ressuspendemos em 450ul de meio LB líquido e deixamos agitando a 37°C por 1 hora. Após esse período, esse meio foi plaqueado em meio LB ágar com antibiótico (ampicilina e cloranfenicol) e deixado na estufa em overnight para o

crescimento das colônias transformadas. Vale ressaltar que os vetores tinham gene de resistência a ampicilina e cloranfenicol como marcas de seleção, o que permitia ter controle do processo de transformação, uma vez que as colônias bacterianas que crescessem no meio LB ágar seriam aquelas transformadas.

### **5.2.2. Cultivo e Indução das Proteínas Recombinante**

As colônias transformadas foram cultivadas em 3 ml de LB líquido contendo os seguintes antibióticos, ampicilina (100 $\mu$ l/mL) e clorofenicol (34 $\mu$ l/mL) por 16 horas a 37 °C sob agitação constante. Após o crescimento das colônias, foi adicionado 1,5mL deste pré-inóculo em 500 mL de meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos. Posteriormente, o conteúdo foi incubado a 37 °C sob agitação constante até atingir uma absorbância de  $A_{600} = 0.7$  D.O. Após alcançado a absorbância, foi adicionado indutor de expressão, IPTG, na concentração final de 1mM.

O conteúdo foi incubado a 37 °C sob agitação constante, ficando em overnight. No outro dia, a solução foi transferida para tubos *falcon* de 50mL e centrifugada a 4.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e guardou-se o *pellet* para próxima etapa de sonicação. Ressuspendemos o pellet em tampão de extração contendo, 20mM Tris pH8.0, 500Mm NaCl, 1Mm de PMSF e glicerol a 10%. Todo o processo para produção das proteínas, transformação, cultivo e expressão das proteínas, está esquematizado na figura abaixo (figura 13).

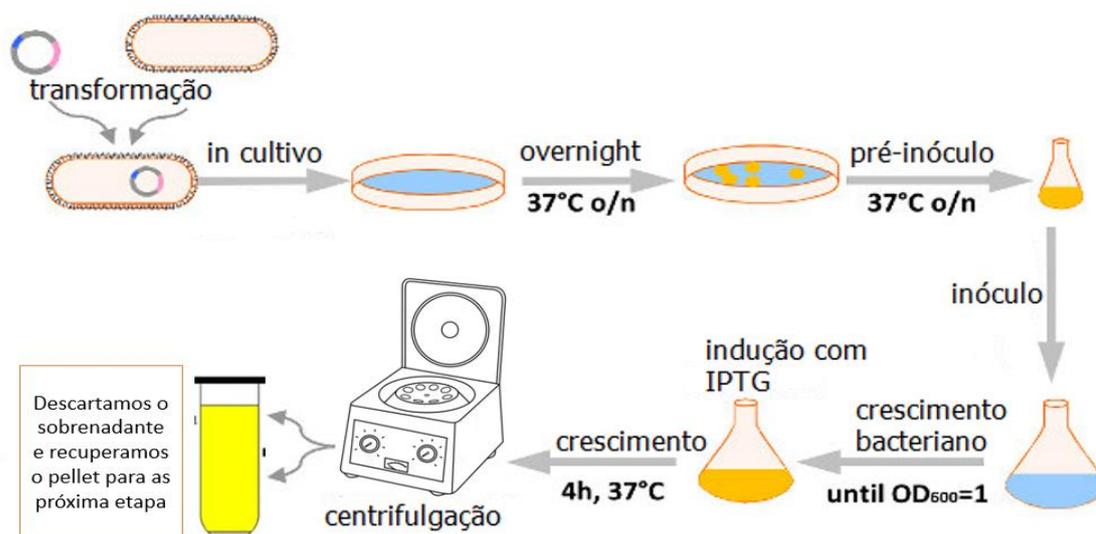


Figura 13 - Esquema metodológico para produção das variantes do Bloco-2 da PvMSP1, aplicados no presente estudo

Em seguida, foram submetidas ao processo de lise celular por sonicação, considerando os seguintes ciclos: dois ciclos de 20 decibéis por 30 segundos, 2 ciclos de 40 decibéis por 30 segundos, 2 ciclos de 60 decibéis por 15 segundos e 2 ciclos de 15 decibéis por 15 segundos. O produto da sonicação foi centrifugado por 15 min a 14000 RPM e o pellet contendo resto celulares foi descartado e o sobrenadante contendo proteína recuperado para etapa de purificação.

### 5.2.3. Análise da Expressão das Proteínas Recombinantes

Para a análise da expressão das proteínas recombinantes, utilizou-se a técnica de eletroforese em gel poliacrilamida-SDS-PAGE 15% SDS, na presença da solução acrilamida/bisacrilamida 30%, Tris 1M pH 8,8, persulfato de amônia a 10% (PSA); dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 6ul de Temed e água miliQ para um volume final de aproximadamente 15ml seguindo Maniatis e colaboradores (1989). As proteínas foram aplicadas no gel com tampão de corrida (Tris 0,01M, pH 6,8; SDS 10%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,06% e DTT a 4%) e em seguida denaturadas por aquecimento á 95°C por 10 minutos. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 100 V por 90

minutos. Após corrida em gel de poliacrilamida, fixou-se a proteína em solução corante contendo azul de Coomassie (Coomassie blue 0,2%), ácido acético glacial 7%, etanol 40%, diluídos em H<sub>2</sub>O destilada, que além de fixá-las, mantém as proteínas desnaturadas. Uma vez coradas, foram submetidas à descoloração, utilizando os mesmos reagentes citados acima, exceto o Coomassie, para visualização e análise de proteínas.

#### **5.2.4. Purificação das Proteínas Recombinantes**

A proteína foi purificada pela técnica denominada Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado (IMAC), desenvolvida por Porath em 1975. Neste estudo, utilizou-se a coluna de purificação contendo íons Ni<sup>2+</sup> (Qiagen®) em afinidade a cauda de Histidina inserida na proteína. A retenção da proteína PvMSP-1, foi testada em várias concentrações de imidazol, em duplicata. Para a realização da purificação das proteínas recombinantes foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C.

A coluna de purificação contendo íons Ni<sup>2+</sup> foi previamente lavada com H<sub>2</sub>O e tampão de lise. Posteriormente, foi adicionado o sobrenadante lisado, contendo a proteína (de 1 em 1 ml). Em seguida foram realizadas lavagem para verificar a retenção da proteína PvMSP1 na coluna, seguindo as seguintes concentrações de Imidazol 20Mm; 40Mm; 60Mm; 80Mm. O tampão de eluição com imidazol foi adicionada sempre de duas vezes de 500 ul, nas seguintes concentrações: 100Mm, 200Mm, 300Mm, 400Mm e 500Mm de Imidazol sendo separadas em alíquota E1 e E2. Todas as alíquotas foram armazenadas a -20°C. O monitoramento deste processo foi realizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS-PAGE 15%. As proteínas foram quantificadas utilizando a curva de BSA, seguindo o método de Bradford (Bio-Rad®) (1976) e densidade óptica por espectrofotômetro.

### 5.2.5. Quantificação das proteínas

As proteínas produzidas foram quantificadas pelo método de Bradford (BIORAD), usando uma curva padrão de acordo com as especificações do fabricante. Esse método colorimétrico é baseado na absorvância do corante Coomassie Brilliant Blue G-250. O valor de absorvância é diretamente proporcional à massa de proteína total na amostra. Primeiramente os valores de DO's obtidos pela absorvância de BSA foram aplicados na equação de reta com valor de  $R^2=0,99159$ , e assim foram quantificados cada proteína, sendo P2 (500ug/ml) P4 (358ug/ml) P5 (288ug/ml), P6 (212ug/ml) e P7 (312ug/ml).

### 5.2.6. Antigenicidade das proteínas por *Western Blotting* (WB)

Para avaliar a funcionalidade das proteínas aqui produzidas, como ferramenta para detecção de anticorpos em Imunoensaios, fizemos o *western blotting* das proteínas, por ser uma técnica de alta sensibilidade e especificidade para detecção, caracterização e quantificação de proteínas. Para verificar a pureza das amostras purificadas, as proteínas separadas por eletroforese vertical SDS-PAGE em géis de poliacrilamida a 12%. Em seguida, foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,2 mm Hybond ECL - GE Healthcare) usando tampão de transferência (188 mM Glicina, 25 mM Tris, 20% metanol) em um sistema de Western nas condições de 20 V, 150W e 700 mA por 90 minutos.

Em seguida, as membranas foram bloqueadas com PBS/leite 5% por 1 hora, para evitar reações inespecíficas. Em seguida, foram lavadas com água destilada e incubadas com os anticorpos primários na proporção 1:1000 por 1 hora. Após 3 lavagens com PBS + 0,05% de Tween (PBS-T) por 5 minutos cada, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado com peroxidase (KPL, EUA) na

proporção 1:2000, por 30 minutos. Novamente, seguido de 3 lavagens com PBS-T, as membranas foram reveladas por 5 minutos, acrescentando a solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de oxigênio) ultrapuro a 1,5mL/mL, na presença de DAB (3,3',4,4' Diaminobenzidina) (BioRad, EUA) a 0,5 mg/mL, diluídos em PBS. Após lavagem com água e secagem com papel, observaram-se as bandas correspondentes às proteínas variantes do bloco 2 da PvMSP1 com seus respectivos pesos moleculares.

### **5.3. Imunoensaio por Elisa Indireto para avaliação da resposta humoral dos grupos estudados**

A presença de anticorpos e suas subclasses em soros de pacientes infectados por *Plasmodium vivax*, foram investigadas através da técnica *Enzyme Linked Immuno Sobot Assay* (ELISA), baseada nas variantes do Bloco 2 de PvMSP-1. Conforme o protocolo pre-estabelecido pelo Laboratório, os poços foram sensibilizados com as proteínas recombinantes, numa concentração de 4 micrograma/ml, diluída em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.6 e deixado overnight a 4° C.

Dia seguinte, os poços foram lavados 6 vezes com PBS Tween 0,05%, e bloqueados com PBS1X+leite 3%, adicionando-se 300uL/poço e incubados a 37°C por 2 horas. Seguidamente, os soros foram diluídos a 1/100 e colocados nos poços, incubando-os em câmara úmida em estufa a 37°C, por 1 h e em seguida lavados 6 vezes em PBS Tween 0,05%. Conjugado anti-IgG humano peroxidase KPL diluídos a 1/2000 foram adicionados nos poços e incubados a 37°C por 1 h e, em seguida, lavados 6 vezes em PBS Tween 0,05 %. O Substrato cromogênico Tetrametilbenzidina 1M (TMB - Sigma) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (água oxigenada) foram adicionados em cada well da placa (50µl) por 10 minutos para revelação da reação que, em seguida, foi interrompida com 50uL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2M. A

densidade óptica (D.O) foi determinada por uma leitora de ELISA (Thermo®) utilizando filtro de 450nm em leitor de ELISA.

Para determinação das subclasses de IgG, foram utilizados anticorpos monoclonais de camundongo direcionados a cada subclasse de IgG humana (Sigma, St. Louis, MO) diluído de acordo com as instruções do fabricante, utilizando um painel de soros que foram positivos no ELISA anterior. Todos os soros foram testados em diluições de 1:100, e a ligação do anticorpo monoclonal foi detectado com imunoglobulina conjugado com peroxidase anti-mouse (Sigma). O “cut-off” foi calculado pela média das D.O. de 20 amostras de soros negativos mais duas vezes o desvio padrão. Para determinar se as amostras eram positivas, consideramos aqueles que apresentavam cut-off maior que 0,1 para IgG total (P2, P4, P5, P6, P7) e subclasse (IgG1, IgG2, IgG3).

#### **5.4. Análises Dos Dados**

Os resultados obtidos no presente estudo foram analisados utilizando os programas estatísticos PRISMA versão 5.0 (Graph Pad Software®) e PASW versão 8.0. Para comparar a média dos níveis de anticorpos entre os diferentes grupos, foi utilizado as correlações entre diferentes variáveis foram feitas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, os níveis de anticorpos foram comparados pela análise comparação múltiplas de Dunnets.

As análises de contingência (soropositivo x soronegativos) foram realizadas por QI-quadrado, e para análise de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo. Foi realizada análise de regressão logística para avaliar se os indivíduos assintomáticos seriam identificados com a soropositividade às proteínas e suas respectivas subclasses de IgG. Inicialmente, foi realizado análise univariada entre assintomáticos e os outros dois grupos (sintomáticos e não infectados) para cada proteína

e seus respectivos anticorpos (IgG total, IgG1, IgG2 e IgG3). Aqueles parâmetros (proteína e seus respectivos anticorpos) que conseguiram distinguir os assintomáticos dos outros grupos foram usados para a análise de regressão logística multivariada.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Produção de proteínas recombinantes do bloco 2 da proteína-1 da superfície de merozoíto (MSP1) para avaliação da resposta humoral em indivíduos

Dentre essas variações do bloco 2 da PvMSP1, observamos que existiam repetições que distinguiram cinco famílias principais de alelos, sendo eles:

1. DENAKRGSQS--GAQNNAAQSTGNTETG .....repeats..... PAAPAAP
2. DENAKRGGQS--GAQTDGHQ .....repeats.....QAPAAP or QARAD
3. DENAKRGGQYTDMINGNGTQADGTQ.....repeats.....PAAPAA  
STENDKRNGQYTDMINGNGTQADGTQ .....repeats..... PAAPAA
4. AENKKRSGHPTTTTNGAGTQPANGSIA.....repeats.....PPATADA or PPAAADA
5. EEHKKRGGQYT-----GAQTDGHQ .....repeats..... QARAD

A maioria destas famílias alélicas apresentou várias repetições aleatórias que apareceram como hexapeptídeos ou mais: STGTG, SSGTG, SSNSG-STGHG, SSGTTQNSG; SSGLG; SSGPG; a repetição dupla SSGTG-SSDSG; e STVTG. Algumas famílias alélicas compartilhavam sequências híbridas: QSTNTTNGTGAQ, STISGNGAQ e SSGSSVSSVVSG. A jusante, encontramos as sequências alélicas não repetidas alélicas QAPAAP, QARAD ou QARAG, PAAPAA, PPATADA e PPAAADA, bem como sequências híbridas compostas de SSTNANYEA, SRTD TDYNA, SSPTDENYTN e SSTNEDYDEK.

O extenso polimorfismo antigênico dentro das sequências alélicas do Bloco 2 da PvMSP-1 foi incorporado em um painel de cinco proteínas recombinantes, denominadas

de P2, P4, P5, P6 e P7, expressas como proteínas marcadas com 6-histidina, com tamanho entre aproximadamente 8,6 kDa e 30 kDa (figura 14).

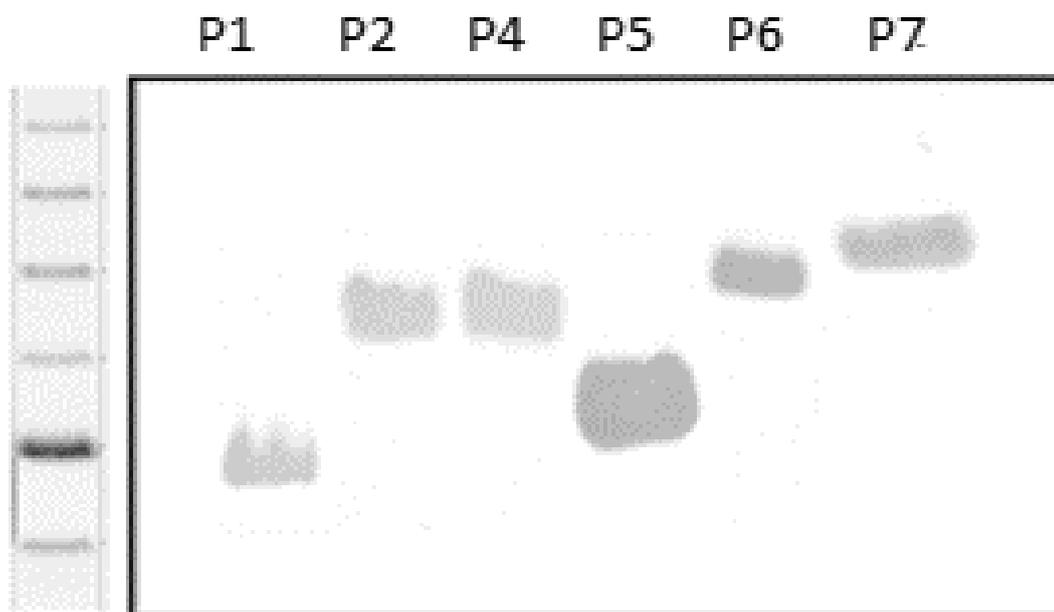


Figura 14 - análise da purificação das proteínas recombinantes variantes do bloco 2 da PvMSP1 (P2, P4, P5, P6 e P7) em gel de poliacrilamida SDS Page 15%

## 6.2. Soroprevalência de IgG e subclasses contra variantes do bloco 2 da PvMSP1.

Os 114 indivíduos soros foram separados em sintomáticos (N=15), assintomáticos (N=25) e não-infectados (N=74). Os níveis de IgG foram quantificados para cada proteína variante do bloco 2 da PvMSP1 (P2, P4, P5, P6 e P7). Todos os soros responderam para pelo menos uma proteína, porém em níveis diferentes. A soropositividade contra a proteína N-terminal foi realizada no estudo de Versiani e colaboradores (2013) e inserida nas comparações abaixo (figura 15).

Todos os soros, de três grupos responderam para pelo menos uma proteína. Considerando a proteína P2, houve um reconhecimento da proteína de 100% dos soros de sintomáticos (M+ PCR+) e assintomáticos (M- PCR+) frente a proteína em questão, e 71% dos não-infectados (M- PCR-) reconheceram a P2. Em relação a proteína 4 (P4),

72% dos sintomáticos (M+ PCR+), 81% dos assintomáticos (M- PCR+) e 80% dos não-infectados (M- PCR-), responderam a proteína. Na proteína 5 (P5), vimos um padrão de reconhecimento de 18% para sintomáticos, 72% para assintomático e 31% para os não-infectados. Enquanto na proteína 6 (P6), 76% dos assintomáticos, 58% dos assintomáticos e 9% dos não infectados, apresentaram reatividade positiva.

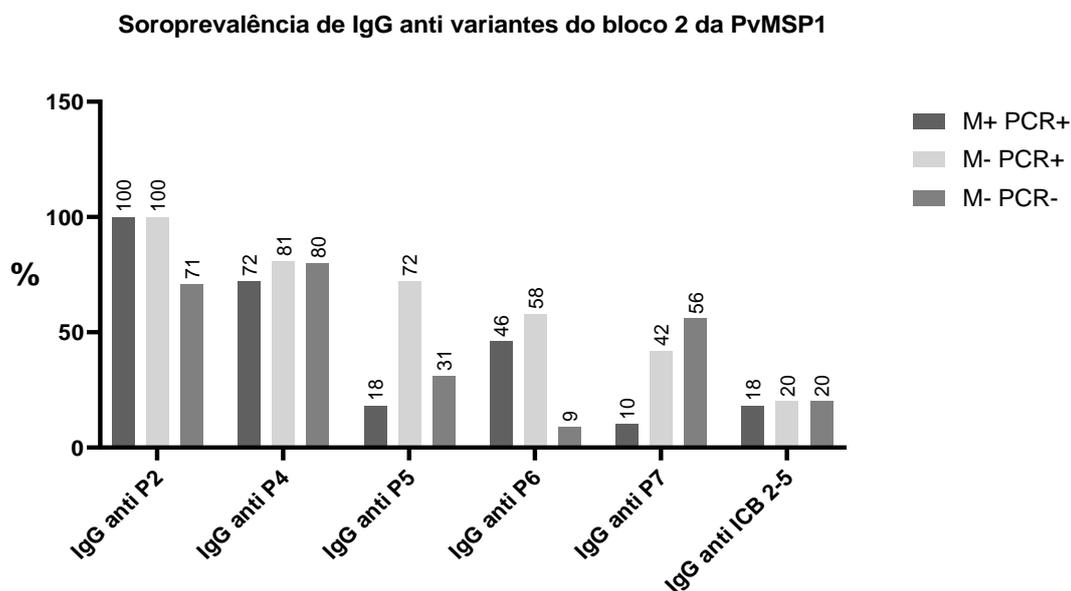


Figura 15 - Percentual de IgG total anti proteínas recombinantes variantes do Bloco-2 da PvMSP-1.

E por fim, na proteína 7 (P7), 10% dos soros de sintomáticos, 42% dos assintomáticos e 56% dos não infectados apresentaram reatividade contra a referente proteína. De modo geral, podemos inferir, que as proteínas P2, P4 e ICB2-5, possui um padrão de reconhecimento homogêneo, e por isso não consegue distinguir os grupos. Enquanto P6, P6 e P7 possui um padrão de reconhecimento heterogêneo, onde um número significativo de soros não conseguiram reconhecê-las. Essa falta de reconhecimento dos soros de indivíduos que já foram expostos (sintomáticos e assintomáticos) pode ser explicada pela sequência das proteínas serem de regiões polimórficas.

Após a soro prevalência de IgG, submetemos todas os soros que apresentaram reatividade positiva frente aos nossos antígenos, a uma análise de subclasse de IgG1, IgG2 e IgG3. Quando analisado a soro prevalência de IgG1 frente as variantes do Bloco-2 da PvMSP1 (figura 16), vimos que dentro do grupo de sintomático (M+PCR+) houve reatividade para P2 (71%), P4(22%), P5(29%), P6(8%) e P7(50%). A proteína ICB2-5 não apresentou positividade para esse grupo. Já o grupo assintomático (M-PCR+) todas as proteínas apresentaram positividade: P2(22%), P4(18%), P5 (2%), P6 (31%), P7(40%) e ICB2-5(5%). E por fim, os não-infectados apresentaram baixa frequência de reconhecimento para P2(19%), P5(4%), P6(4%), P7(3%). Nesse mesmo grupo, não houve reatividade de IgG1 anti-P4 e nem anti-ICB2-5.

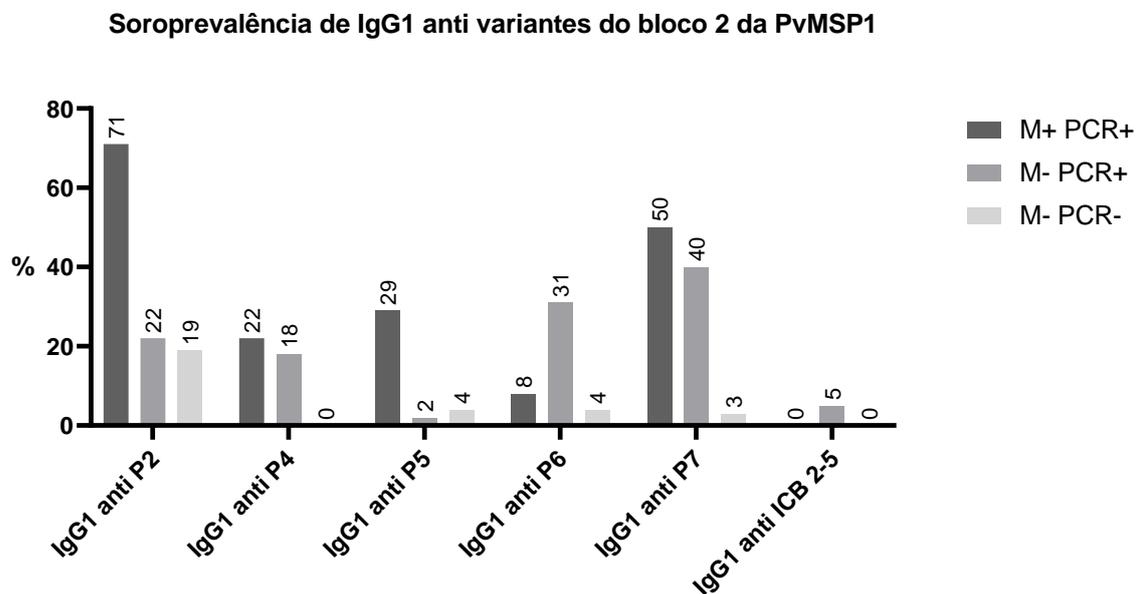


Figura 16 - Percentual de IgG1 anti proteínas recombinantes variantes do Bloco-2 da PvMSP-1

Quando analisado a soroprevalencia de IgG2 (figura 17), podemos observar que houve pouco reconhecimento entre os grupos, menos de 40% das amostras apresentaram reconhecimento de Ig2anti variantes do Bloco 2 da PvMSP1. Os sintomáticos

apresentaram soroprevalência para todas as proteínas, enquanto os assintomáticos apresentaram positividade apenas para P5, P6, P7 e ICB2-5. Já os não infectados apresentaram reatividade apenas para P6 e ICB2-5.

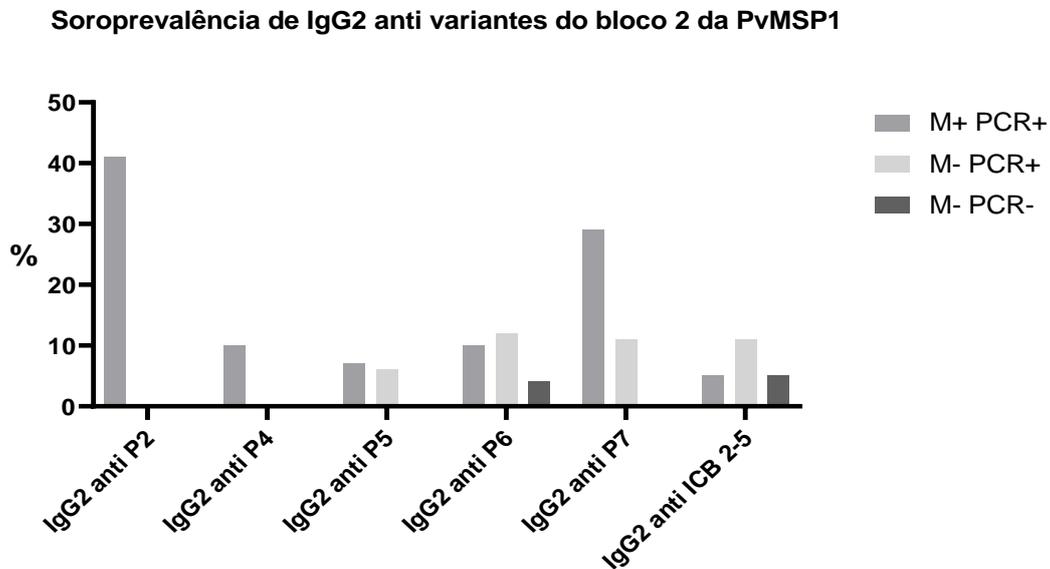


Figura 17 - Percentual de IgG2 anti proteínas recombinantes variantes do Bloco-2 da PvMSP-1

A subclasse IgG3 apresentou uma soroprevalência interessante no ponto de vista de proteção clínica a malária. Vimos que todos os grupos apresentaram um excelente reconhecimento frente as proteínas, no entanto, os assintomáticos e os não-infectados, grupos que apresentam determinada proteção clínica a malária, foram mais responsivos frente a maioria das proteínas, sendo elas: P5, P6, P7 e ICB2-5. As proteínas 4 (P4) e 5(P5) apresentaram um reconhecimento homogêneo em todos os grupos.

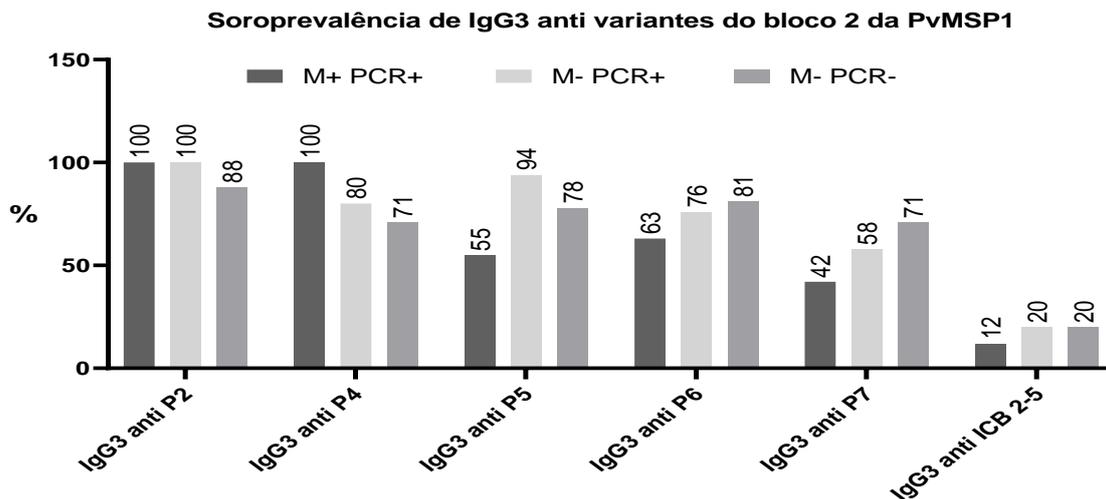


Figura 18 - Percentual de IgG3 anti proteínas recombinantes variantes do Bloco-2 da PvMSP-1

Considerando o grupo dos sintomáticos, houve uma maior soroprevalência de IgG3 para as proteínas P2 e P4. E uma menor soroprevalência para ICB2-5. Já os assintomáticos apresentaram maiores prevalência para as proteínas P2, P4, P5 e P6, e uma menor prevalência para ICB2-5. Os não infectados (PCR-/M-), P2, P4, P6 e P7 apresentaram uma boa resposta anti IgG3. A caracterização das subclasses indicou que IgG1 e IgG3 predominaram a resposta contra as variantes, enquanto a subclasse IgG2 mostrou baixa reatividade. A partir deste ponto, observa-se que a subclasse IgG3 foi predominante nos indivíduos em geral, mas assintomáticos e não infectados apresentaram os maiores níveis de reconhecimento

### 6.3. Sensibilidade e especificidade das proteínas variantes do bloco 2 da PvMSP1

Considerando que todas as proteínas foram positivas para os indivíduos expostos a malária, seja ele sintomático, assintomático ou não infectado, a presente análise propôs verificar o nível de sensibilidade e especificidade de cada proteína para detecção de níveis

de IgG total e subclasse (tabela abaixo). E assim predizer quais as proteínas usar para diferenciar o grupo dos assintomáticos dos não infectados. Logo, vimos que a P2 seria uma proteína promissora, mostrando de 100% de sensibilidade para captar anticorpos IgG e a subclasse IgG3 e apresentando uma especificidade de 76% para IgG3. Quanto a P4 foi 80% sensível e 41% específica para IgG3. A p5 foi 96% sensível, e 69% específica para IgG total. A proteína 6 apresentou 84% de sensibilidade e 91% de especificidade para IgG total e 56% de sensibilidade e 91% de especificidade para IgG1.

Os valores de razões de verossimilhança dos indivíduos assintomáticos com soropositividade de IgG total e as subclasses IgG3 para as proteínas P4, P5 e P7 mostraram valores preditivos importantes (Tabela 1).

Tabela 1 - Sensibilidade e especificidade das proteínas variantes do bloco 2 da PvMSP1

Assintomático x não infectados	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Razão de verossimilhança
P2_IgG_TOTAL	0,4032	1	1	0,5	0,00
P2_IgG1	0,03704	0,6667	0,04	0,6486	0,11
P2_IgG3	0,4808	1	1	0,6351	0,00
P4_IgG_TOTAL	0,3778	0,8519	0,68	0,6216	2,55
P4_IgG1	0	0,7475	0	1	0,00
P4_IgG3	0,6897	0,9286	0,8	0,8784	9,66
P5_IgG_TOTAL	1	0,9367	0,8	1	15,80
P5_IgG1	0	0,7475	0	1	0,00
P5_IgG3	0,6	0,766	0,12	0,973	2,56
P6_IgG_TOTAL	1	0,9024	0,68	1	10,25
P6_IgG1	0	0,7475	0	1	0,00
P6_IgG3	0	0,7475	0	1	0,00
P7_IgG_TOTAL	0,7778	0,8642	0,56	0,9459	5,73
P7_IgG1	0	0,7475	0	1	0,00
P7_IgG3	0,5455	0,7841	0,24	0,9324	2,53
Nterm PvMSP1_IgG_TOTAL	0,375	0,7867	0,36	0,7973	1,76
Nterm PvMSP1_IgG1	1	0,7629	0,08	1	4,22
Nterm PvMSP1_IgG3	0,5	0,8101	0,4	0,8649	2,63

**6.4. Níveis de IgG total e Subclasses (IgG1, IgG2 e IgG3) contra as proteínas variantes do bloco 2 de PvMSP1 em indivíduos residentes na comunidade Rio Pardo, agrupados em sintomáticos, assintomáticos e não-infectados com malária vivax.**

Os níveis de IgG em indivíduos sintomáticos contra a P2 foram maiores nos sintomáticos e assintomáticos e diferiram estatisticamente dos não-infectados (figura 19).

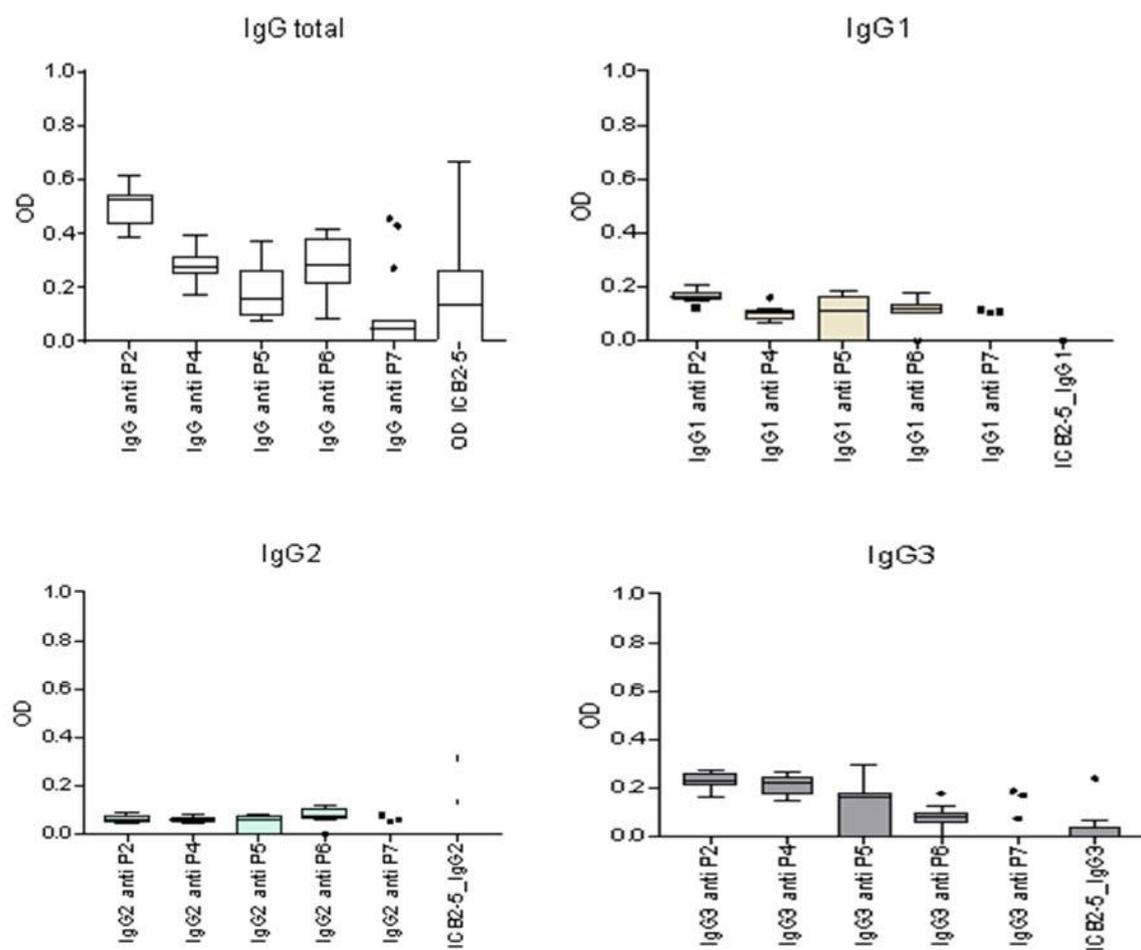


Figura 19 - Níveis de IgG total e Subclasses (IgG1, IgG2 e IgG3) contra as proteínas variantes do bloco 2 de PvMSP1 em indivíduos sintomáticos para malária vivax.

Com a P4, os níveis nos assintomáticos foi estatisticamente maior que os não-infectados. A proteína P2 foi a que apresentou maior reatividade de IgG total, seguida pela P6, P7 e ICB2-5. No entanto não houve diferença de positividade entre as proteínas. Quando analisado a subclasse, vimos IgG1 e IgG3 foram predominantes, e IgG2 apresentou baixo reconhecimento frente as proteínas recombinantes. Os níveis de Ig1 anti-P2, anti-P4, anti-P5 e anti-P6 variaram de 0,1 a 0,2, enquanto os níveis de IgG3 anti-P2, anti-P4 e anti-P5 variaram de 0,1 a 0,4.

No grupo de indivíduos assintomáticos, os níveis de IgG total apresentaram-se expressivos (figura 20), com DO variando de 0,1 a 1, sendo as proteínas P2 e ICB2-5 as mais reconhecidas.

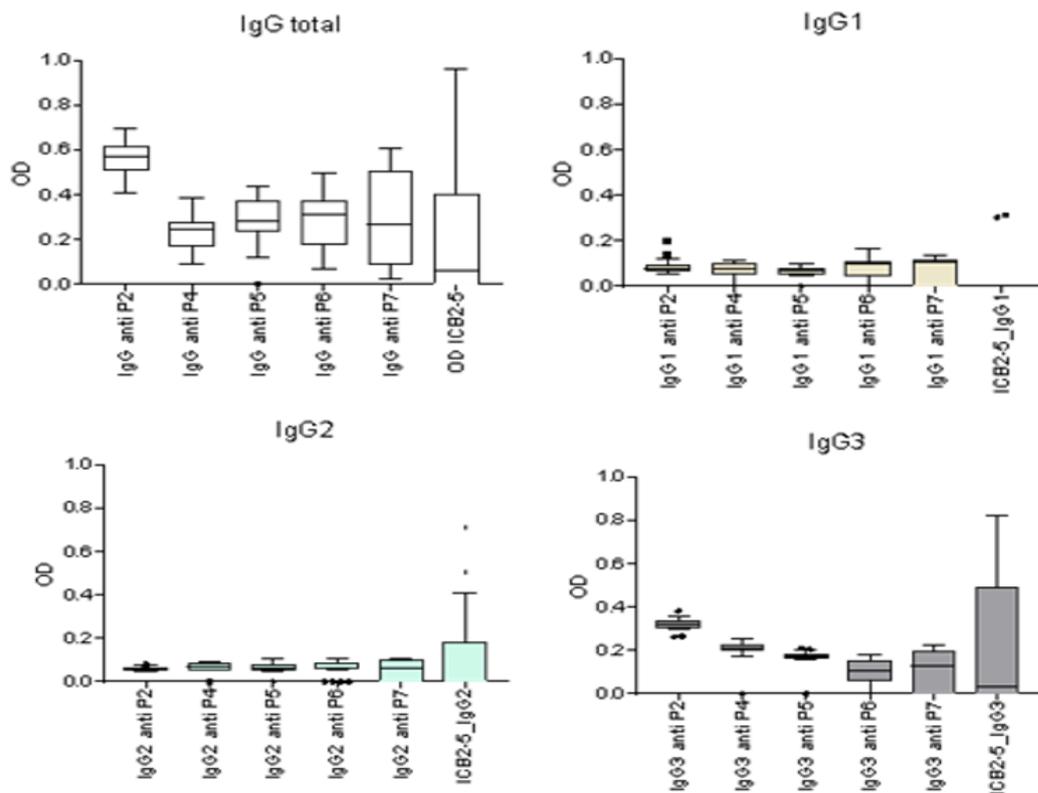


Figura 20 - Níveis de IgG total e Subclasses (IgG1, IgG2 e IgG3) contra as proteínas variantes do bloco 2 de PvMSP1 em indivíduos Assintomáticos para malária vivax.

Os níveis de das subclasses IgG3 sempre foram mais elevados observamos novamente a proteína recombinante (P2) sendo a mais reativa, apresentando média de D.O. = 0,575 para IgG total. Seguida pela P6 (D.O.=0,313), P5 (D.O.=0,308), P7 (D.O.=0,288) e por fim P4 (0,238). Quanto as subclasses, a IgG1 e IgG3 foram as mais reativa para todas as proteínas enquanto a IgG2 apresentou positividade quase nula

Considerando que o grupo não-infectado, na quantificação de IgG total foi observado que as proteínas P2 (D0=0,270) e P4 (DO=0,124) foram as mais reativas, seguida pela P7, P5 e P6. Quanto as subclasses, diferente dos outros grupos, tivemos a presença das três subclasses, sendo a IgG1 e IgG3 mais reativa (figura 21).

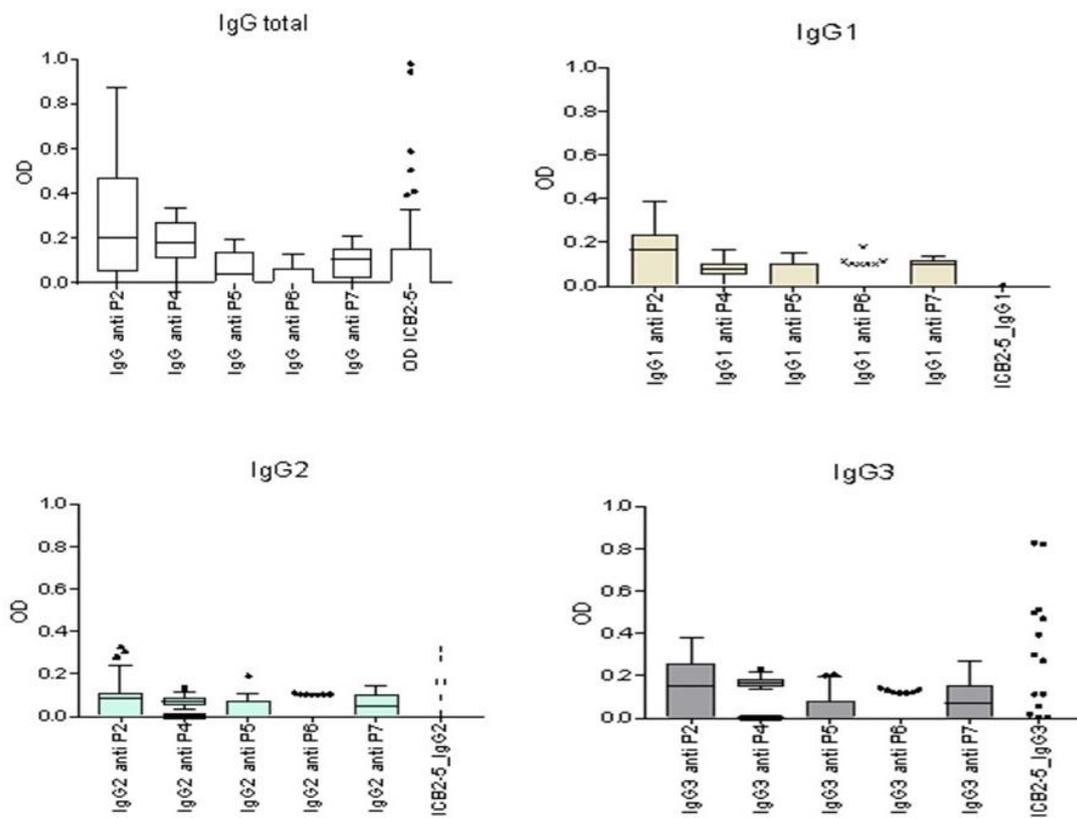


Figura 21 - Níveis de IgG total e Subclasses (IgG1, IgG2 e IgG3) contra as proteínas variantes do bloco 2 de PvMSP1 em indivíduos não-infectados.

De modo geral, podemos observar que a média de absorbância das DO entre os grupos foram diferentes, sendo que o grupo assintomático apresentou maiores médias na subclasse IgG3 que diferiu dos outros grupos.

### 6.5. Comparação dos níveis de anticorpos contra proteínas do bloco 2 da PvMSP1

Os níveis de anticorpos dos assintomáticos foram confrontados contra os dois grupos (sintomáticos e não-infectados por análise de Dunnett, que tratou de comparação múltiplas (tabela 2).

Tabela 2 - Teste de comparação múltipla de Dunnett

Teste de comparação múltipla		Diferença da média	IC 95%	P
P2	IgG PCR+/M- vs. PCR+/M+ vs. PCR-/M-	0,0705	-0,0103 -- 0,1513	0,0969
		0,2969	0,2397 -- 0,3541	<0,0001
	IgG1 vs. PCR+/M+ vs. PCR-/M-	-0,08402	-0,1648 -- 0,003222	0,04
		-0,06782	-0,125 -- -0,01059	0,0167
	IgG2 vs. PCR+/M+ vs. PCR-/M-	-0,00471	-0,08551 -- 0,07609	0,9878
		-0,01963	-0,07686 -- 0,0376	0,6656
	IgG3 vs. PCR+/M+ vs. PCR-/M-	0,0951	0,0143 -- 0,1759	0,0176
		0,1689	0,1117 -- 0,2261	<0,0001
P4	IgG vs. PCR+/M+ vs. PCR-/M-	-0,0471	-0,1279 -- 0,0337	0,3293
		0,0592	0,001971 -- 0,1164	0,0413
	IgG1 vs. PCR+/M+ vs. PCR-/M-	-0,02165	-0,1024 -- 0,05915	0,7772
		0,00561	-0,05162 -- 0,06284	0,9661
	IgG2 vs. PCR+/M+ vs. PCR-/M-	0,0082	-0,0726 -- 0,089	0,9637
		0,00742	-0,04981 -- 0,06465	0,9416
	IgG3 vs. PCR+/M+ vs. PCR-/M-	-0,0094	-0,0902 -- 0,0714	0,9526
		0,0636	0,006371 -- 0,1208	0,0264
P5	IgG vs. PCR+/M+ vs. PCR-/M-	0,107	0,0262 -- 0,1878	0,0066
		0,2262	0,169 -- 0,2834	<0,0001
	IgG1 vs. PCR+/M+ vs. PCR-/M-	-0,03085	-0,1116 -- 0,04995	0,6065
		0,03392	-0,02331 -- 0,09115	0,318
	IgG2 vs. PCR+/M+ vs. PCR-/M-	0,01449	-0,06631 -- 0,09529	0,8918
		0,03757	-0,01966 -- 0,0948	0,2505

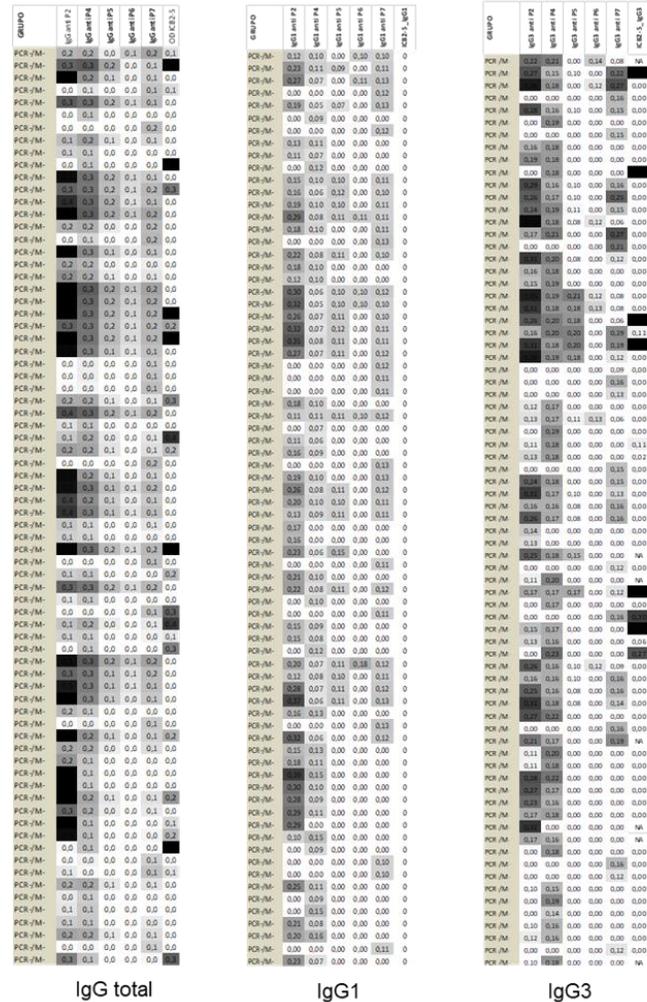
	IgG3	vs. PCR+/M+	0,0381	-0,0427 -- 0,1189	0,4739
		vs. PCR-/M-	0,1309	0,0737 -- 0,1882	<0,0001
P6	IgG	vs. PCR+/M+	0,0084	-0,0724 -- 0,0892	0,962
		vs. PCR-/M-	0,2612	0,2039 -- 0,3184	<0,0001
	IgG1	vs. PCR+/M+	-0,03414	-0,1149 -- 0,04666	0,5452
		vs. PCR-/M-	0,07099	0,01376 -- 0,1282	0,0117
	IgG2	vs. PCR+/M+	-0,01545	-0,09625 -- 0,06535	0,8782
		vs. PCR-/M-	0,0553	-0,001933 -- 0,1125	0,06
	IgG3	vs. PCR+/M+	0,01937	-0,06143 -- 0,1002	0,8165
		vs. PCR-/M-	0,09047	0,03324 -- 0,1477	0,001
P7	IgG	vs. PCR+/M+	0,1822	0,1014 -- 0,263	<0,0001
		vs. PCR-/M-	0,1937	0,1364 -- 0,2509	<0,0001
	IgG1	vs. PCR+/M+	0,05989	-0,02091 -- 0,1407	0,1772
		vs. PCR-/M-	0,01917	-0,03806 -- 0,0764	0,6778
	IgG2	vs. PCR+/M+	0,04636	-0,03444 -- 0,1272	0,34
		vs. PCR-/M-	0,00812	-0,04911 -- 0,06535	0,9305
	IgG3	vs. PCR+/M+	0,08763	0,006832 -- 0,1684	0,0309
		vs. PCR-/M-	0,0368	-0,02043 -- 0,09403	0,2638
OD ICB2-5	IgG	vs. PCR+/M+	0,1466	0,0658 -- 0,2274	0,0001
		vs. PCR-/M-	0,1992	0,142 -- 0,2564	<0,0001
	IgG1	vs. PCR+/M+	0,02806	-0,05849 -- 0,1146	0,6942
		vs. PCR-/M-	0,0281	-0,03269 -- 0,08889	0,4871
	IgG2	vs. PCR+/M+	0,06931	-0,01723 -- 0,1559	0,1361
		vs. PCR-/M-	0,08841	0,02762 -- 0,1492	0,0026
	IgG3	vs. PCR+/M+	0,2053	0,1188 -- 0,2919	<0,0001
		vs. PCR-/M-	0,1695	0,1087 -- 0,2303	<0,0001

Em relação a sorologia contra a P2, IgG total distinguiu os assintomáticos do grupo de não-infectados. Curiosamente, a IgG1 também distinguiu, porém inversamente, ou seja, os níveis de anticorpos IgG1 contra P2 nos assintomáticos foi menor que os sintomáticos e não infectados. A subclasse IgG3 anti-P2 distinguiu os assintomáticos dos outros dois grupos, por níveis maiores de anticorpos.

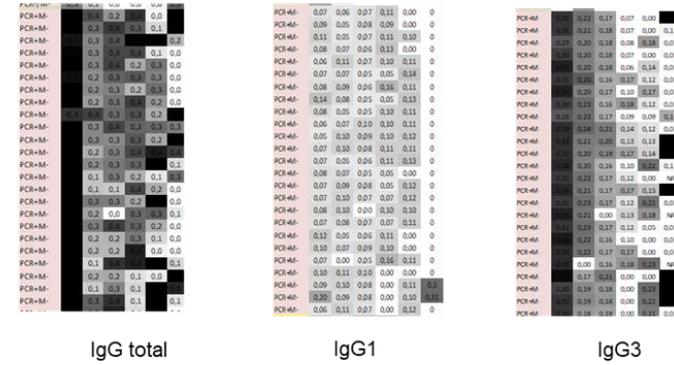
Em relação a P4, a IgG total foi semelhante a P2, e IgG3 distinguiu assintomáticos dos não-infectados. IgG total anti-P5 distinguiu assintomáticos dos dois grupos, e a IgG3 apenas os distinguiu dos não-infectados, semelhante à IgG3 anti-P4. Em relação a P6, os resultados foram os mesmos que a P5. A P7 mostrou um resultado distinto, como a P5, ela distinguiu assintomáticos dos dois grupos com a IgG total, no entanto, a IgG3 distinguiu os assintomáticos dos sintomáticos. E por último a soropositividade contra a proteína N-terminal realizada no estudo de Versiani e colaboradores (2013), mostrou que IgG total e IgG3 distinguiu os assintomáticos dos dois grupos.

Embora esses resultados puderam mostrar individualmente diferenças dos assintomáticos com os dois outros grupos, a cobertura total da soroprevalência continua um problema como pode ser visto na figura 22. Não há uma proteína que os distingue individualmente, e no caso dos soros dos assintomáticos, nem todas as proteínas são reconhecidas de foram regulares e com bons níveis.

Não-infectado



Assintomáticos



Sintomáticos

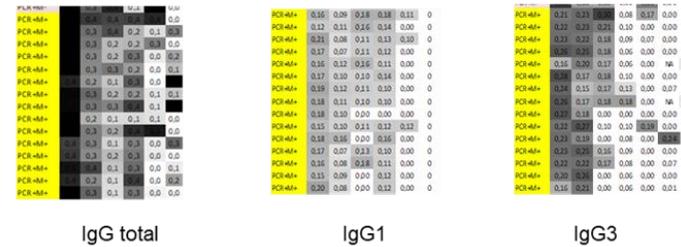


Figura 22 - Descrição da soroprevalência de todos os soros testados.

A análise de regressão logística foi usada para avaliar se os indivíduos assintomáticos seriam identificados com a soropositividade às proteínas e suas respectivas subclasses de IgG (Figura 23). Análise univariada foi realizado inicialmente para cada proteína e seus respectivos anticorpos (IgG total, IgG1, IgG2 e IgG3) entre assintomáticos e os outros dois grupos (sintomáticos e não infectados).

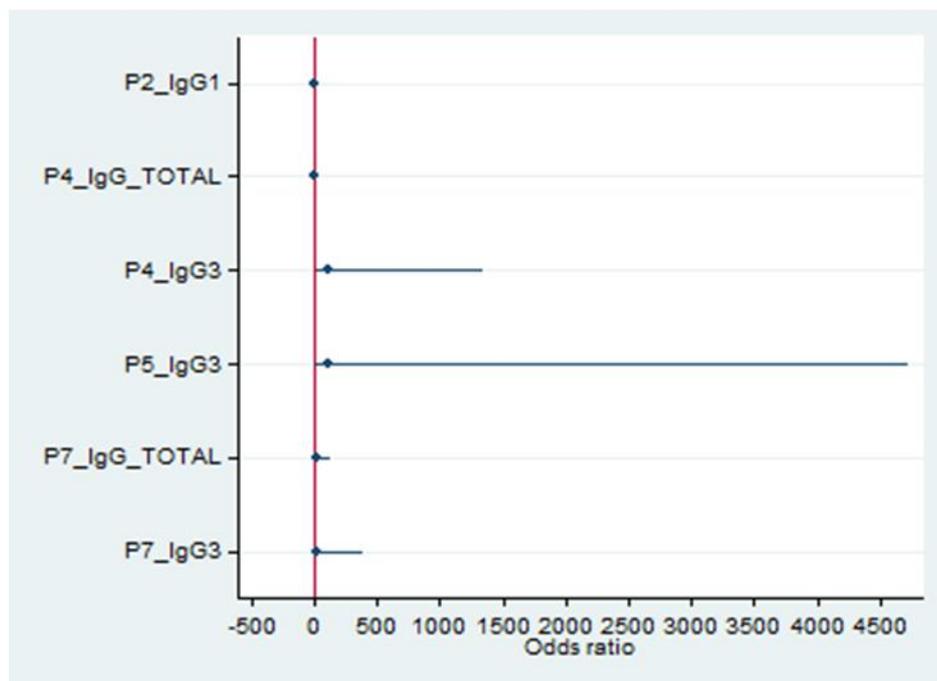


Figura 23 - Análise univariada entre soros de assintomáticos e não-infectados

Foi possível observar que IgG1 anti P2, IgG total anti P4 e P7 e IgG3 anti P4, P5 e P7 conseguiram distinguir os assintomáticos dos outros grupos por análise univariada. Aqueles parâmetros (proteína e seus respectivos anticorpos) que conseguiram foram usados para a análise de regressão logística multivariada. Esses parâmetros analisados em conjunto pela análise de regressão logística multivariada demonstraram razão de verossimilhança na ordem de 17.88 unidades, e pseudo R2 de 0.68 (figura 24). Isto indica que 68% dos assintomáticos seriam identificados combinando a sorologia com proteínas e os três anticorpos (IgG total, IgG1 e IgG3).

outcome2	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
p2_igg1	.0176132	.0286167	-2.49	0.013	.0007292	.4254134
p4_igg_total	5.449414	5.451946	1.69	0.090	.7669245	38.72103
p4_igg3	105.7696	137.1627	3.59	0.000	8.327536	1343.399
p5_igg3	105.1698	204.2315	2.40	0.017	2.338427	4729.964
p7_igg_total	13.17865	15.06824	2.26	0.024	1.401593	123.9139
p7_igg3	21.2374	31.42275	2.07	0.039	1.168606	385.9534
_cons	.007389	.00985	-3.68	0.000	.0005418	.1007608

Logistic regression

Number of obs = 99

LR chi2(6) = 76.12

Prob > chi2 = 0.0000

Log likelihood = -17.883963

Pseudo R2 = 0.6803

Figura 24 - análise de regressão logística multivariada

## 7. DISCUSSÃO

As infecções assintomáticas ou de baixa densidade parasitária são obstáculos para a “Estratégia Técnica Global contra Malária” porque esses indivíduos não são identificados pois não procuram atendimento, devido à ausência de sintomas, e continuam a transmitir o parasita (HEMINGWAY et al., 2016). Por isso, novas ferramentas mais sensíveis e utilizáveis *in loco* são necessárias para identificar esses focos residuais de transmissão (HEMINGWAY et al. 2016; WHO, 2014, 2017). Esse estudo demonstrou que a partir de um conjunto de proteínas variantes do MSP1 de *P. vivax* e uma sorologia baseado em IgG e suas subclasses seria possível prever a existência de amostras assintomáticas com uma probabilidade de 68%. Essa sorologia poderia ser implantável *in loco* como uma ferramenta para identificar as infecções assintomáticas (HEMINGWAY et al.; 2016).

A imunidade clínica à malária é um processo lento, cumulativo da exposição a múltiplas infecções ao longo do tempo. Ela reflete na produção de um repertório de respostas imunes específicas aos antígenos, especialmente àqueles com diversidade antigênica, e fundamenta o conceito de imunidade cepa-específica (MARSH; KINYANJUI, 2006; DOOLAN; DOBANO; BAIRD, 2009). Esse fenômeno foi bem descrito com ortólogo MSP1 do *P. falciparum* (CAVANAGH et al., 1998). Por ser de cópia única no genoma do parasita, o Bloco 2 da MSP1 dá origem a extensões antigenicamente distintas em diferentes linhagens de parasitas, e permitiram a avaliação da imunidade cepa-específica com diferentes proteínas do Bloco 2 do gene MSP1 em *P. falciparum* (CAVANAGH et al., 1998, 2004; FONJUNGO; STÜBER; MCBRIDE, 1998). Em relação ao ortólogo de *P. vivax*, dois estudos observaram a associação de anticorpos contra apenas uma proteína variante do Bloco 2 da MSP-1 (NOGUEIRA et

al., 2006; VERSIANI et al., 2013). Embora ela tenha sido reconhecida por muitos soros e mostrado associação com imunidade clínica, nem todos os assintomáticos a reconheceram. Consistente com essa noção, cinco proteínas construídas baseados na diversidade genética do Bloco 2 do MSP1 dos parasitas circulantes da área central da Amazônia brasileira (SOARES et al., 2014). A soroprevalência de anticorpos contra as variantes do bloco 2 da MSP1 alcançou 100%, sugerindo que esse conjunto de proteínas possa cobrir a diversidade genética dos parasitas circulantes na área. Além disso, os níveis desses anticorpos foram mais elevados nos indivíduos assintomáticos, mostrando seu potencial como ferramenta epidemiológica.

Em relação à resposta humoral, está bem estabelecido que os anticorpos citofílicos (IgG1 e IgG3) são indispensáveis na imunidade contra os estágios eritrocitários do parasita (MARSH; KINYANJUI, 2006). Essa prova de conceito seguiu a associação de IgG3 contra a região N-terminal de MSP1 com a premunicação (imunidade clínica) à malária vivax (NOGUEIRA et al., 2006; VERSIANI et al., 2013). Tal como nossos achados, os anticorpos IgG3 específicos contra um painel de proteínas do Bloco 2 do MSP1 de *P. falciparum* foram associados com a imunidade clínica (CAVANAGH et al., 1998, 2004, 2014). Segundo esses autores, os anticorpos contra proteínas do Bloco 2 da MSP-1 são predominantemente da subclasse IgG3. Esses anticorpos são de curta duração (meia-vida de 7 dias) e requerem uma produção continuada. É estabelecido que a premunicação seja uma imunidade mediada diretamente pela presença dos próprios parasitas e não como resultado de infecções anteriores. De modo que na ausência de exposição contínua, essa imunidade é aparentemente perdida (DOOLAN; DOBANO; BAIRD, 2009). Por isso a necessidade de uma estimulação contínua nos assintomáticos explicaria a manutenção dos níveis de IgG3 associado a premunicação. Assim, a combinação análise da resposta de IgG3 com o conjunto de proteínas do bloco 2 da MSP1

do *P. vivax* apresenta um grande potencial como ferramenta para identificação de casos de malária assintomática.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise da diversidade genética com as sequências disponíveis do PvMSP1 Bloco 2 indicou cinco famílias principais de alelos baseados nas sequências semi-conservadas a montante das repetições (*repeats*).

A caracterização da resposta humoral indicou as duas subclasses IgG3 e IgG1 predominantes na resposta contra as variantes do Bloco 2 do MSP1 de *P. vivax*.

O grupo assintomático apresentou maiores médias na subclasse IgG3 contra todas as variantes e diferiu dos outros grupos.

A análise de regressão logística multivariada mostrou que a combinação da resposta de IgG3 contra o conjunto de proteínas do bloco 2 da MSP1 do *P. vivax* apresenta um grande potencial para identificação de malária assintomática

## **9. PESPECTIVAS FUTURAS**

Este estudo permite a elaboração de um estudo visando a aplicação dessas proteínas e identificação de anticorpos IgG3 numa plataforma de teste rápido. Além de uma soroprevalência maior, os assintomáticos mostraram níveis de anticorpos maiores a ponto de que seja possível introduzir esse parâmetro a mais na ferramenta para detecção destes casos de malária assintomática.

## 10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. ANSTEY, NM, RUSSELL, B., YEO, TW E PRICE, RN. (2009). A fisiopatologia da malária vivax. *Tendências Parasitol.* 25, 220–227
2. ASHLEY EA, PHYO AP. Drugs in Development for Malaria. *Drugs* (2018). 78(9):861–879.
3. BHARTI, PK; SHUKLA, MM; SHARMA, YD; SINGH, N. Genetic diversity in the block 2 region of the merozoite surface protein-1 of *Plasmodium falciparum* in central India. (2012). *Malaria Journal* 11:78.
4. BASTOS, MS; DA SILVA-NUNES, M; MALAFRONTA, HOFFMANN, EHE; WUNDERLICH, G; MORAES, SL; FERREIRA, MU. (2007). Antigenic polymorphism and naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in rural Amazonians. *Clinical Vaccine Immunology* 14(10): 1249-1259.
5. BATTLE KE, KARHUNEN MS, BHATT S, GETHING PW, HOWES RE, GOLDING N, VAN BOECKEL T, MESSINA JP, SHANKS GD, SMITH DL, BAIRD JK, HAY SI, (2014). Geographical variation in *Plasmodium vivax* relapse. *Malaria Journal* 13: 144.
6. BEESON JG, DREW DR, BOYLE MJ, FENG G, FOWKES FJI, RICHARDS JS. (2016). Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS Microbiol. Rev.*
7. BHARTI, PK; SHUKLA, MM; SHARMA, YD; SINGH, N. (2012) Genetic diversity in the block 2 region of the merozoite surface protein-1 of *Plasmodium falciparum* in central India. *Malaria Journal* 11:78.
8. BOUSEMA T, OKELL L, FELGER I, DRAKELEY C. (2014). Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature reviews Microbiology.* 12(12):833–40. pmid:25329408.
9. M.J. BOYLE, L. REILING, G. FENG, C. LANGER, F.H. OSIER, H. ASPELING-JONES, Y.S. CHENG, J. STUBBS, K.K. TETTEH, D.J. CONWAY. (2014) Human antibodies fix complement to inhibit *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malária *Immunity*, 42, pp. 580-590
10. BRANDI, M. C.C. Caracterização e padronização de marcadores genéticos para o estudo de polimorfismos em *Plasmodium vivax*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – USP, 2013.
11. CAVANAGH DR, ELHASSAN IM, ROPER C, ROBINSON VJ, GIHA H, HOLDER A. A. (1998). A longitudinal study of type-specific antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan. *J. Immunol.*161:347–59
12. CAVANAGH, D. R., D. DODOO, L. HVIID, J. A. KURTZHALS, T. G. THEANDER, B. D. AKANMORI, S. POLLEY, D. J. CONWAY, K. KORAM, AND J. S. MCBRIDE. 2004. Antibodies to the N-terminal block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are associated with protection against clinical malaria. *Infect. Immun.* 72:6492–6502
13. CAVANAGH DR, KOCKEN CH, WHITE JH, COWAN GJ, SAMUEL K, DUBBELD MA, VOORBERG-VAN DER WEL A, THOMAS AW, MCBRIDE JS, ARNOT DE (2014). Antibody responses to a novel *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein vaccine correlate with

- protection against experimental malaria infection in Aotus monkeys. PLoS One. 2014, 9: e83704-10.1371/journal.pone.0083704.
14. CHANG, S.P., H.L. GIBSON, C.T. LEENG, P.J. BARR, AND G.S.N. HUI. 1992. A carboxyl-terminal fragment of Plasmodium falciparum gp 195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth. J. Immunol. 149:548.
  15. CHAPPEL, J.A.; HOLDER, A.A. (1993). Monoclonal antibodies that inhibit Plasmodium falciparum invasion in vitro recognise the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. Molecular and biochemical parasitology, v. 60, n. 2, p. 303-311.
  16. CHENG, Y. WANG, D. ITO, D.H. KONG, K.S. HA, J.H. CHEN, (2013). The Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 paralog is a novel erythrocyte-binding ligand of P. vivax Infect Immun, 81, pp. 1585-1595
  17. COWMAN AF, BERRY D, BAUM J (2012). The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. J Cell Biol 198: 961–971
  18. CONWAY, D; CAVANAGH, DR; TANABE, K; ROPER, C; MIKES, ZS; SAKIHAMA, N; BOJANG, KA; ODUOLA, AMJ; KREMSNER, PG; ARNOT, DE; GREENWOOD, BM; MCBRIDE, J. (2000). A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. Nature Medicine, v.6, p.689-692.
  19. CROMPTON, PD; KAYALA, MA; TRAORE, B; KAYENTAO, K; ONGOIBA, A; WEISS, GE; MOLINA DM; BURK CR, WAISBERG M; JASINSKAS, A; TAN, X; DOUMBO, S; DOUMTABA, D; KONE, Y; NARUM, DL; LIANG, X; DOUMBO, OK; MILLER, LH; DOOLAN, DL; BALDI, P; FELGNER, PL; PIERCE, SK. (2010). Affiliations. A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 29: 1-6.
  20. CUTTS JC, POWELL R, AGIUS P A, BEESON JG, SIMPSON J A, FOWKES FJI. Immunological markers of Plasmodium vivax exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. BMC Med. [Internet]. 2014;12:150.
  21. DAS S, HERTRICH N, PERRIN AJ, WITHERS-MARTINEZ C, COLLINS CR, JONES ML, WATERMEYER JM, FOBES ET, MARTIN SR, SAIBIL HR, WRIGHT GJ, TREECK M, EPP C, BLACKMAN MJ. Processing of Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein MSP1 Activates a Spectrin-Binding Function Enabling Parasite Egress from RBCs. Cell Host Microbe. 2015 Oct 14;18(4):433-44. doi: 10.1016/j.chom.2015.09.007. PubMed PMID: 26468747; PubMed Central PMCID: PMC4608996.
  22. DAYANAND, K.K.; KISHORE, P.; CHANDRASHEKAR, V.; RAJESHWARA N. ACHUR, SUSANTA K. GHOSH, SRINIVAS B. KAKKILAYA, SUCHETHA N. KUMARI, SATYANARAYAN TIWARI, ARCHITH BOLOOR, RAJESHWARI DEVI, D. CHANNE GOWDA. (2019). Malaria Severity in Mangaluru City in the Southwestern Coastal Region of India. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Feb; 100(2): 275–279.
  23. Del Portillo, HA; Longacre, S; Khouri, E; David, PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of Plasmodium vivax reveals sequences conserved between different Plasmodium species. Proceedings of the National Academy of Sciences 88(9): 4030, 1991

24. DOUGLAS, NM; NSTEY, NM; BUFFET, PA; POESPOPRODJO, JR; YEO, TW; WHITE, NJ; PRICE, RN. (2012). The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria Journal* 11: 135.
25. DOOLAN, DL; DOBANO, C; BAIRD, JK. (2009). Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiology Review* 22(1): 13-36.
26. FERNANDEZ-BECERRA, C; SANZ, S; BRUCET, M; STANISIC, DI; AALVES, PF; CAMARGO, EP; ALONSO, PL; MUELLER, I; DEL PORTILLO, HA. (2010). Naturally-acquired humoral immune responses against the N- and C-termini of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay. *Malaria Journal* 9: 29e.
27. FONJUNGO PN, STÜBER D, MCBRIDE JS. (1998). Antigenicity of recombinant proteins derived from rhoptry-associated protein 1 of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*, 66(3):1037–1044.
28. GALAMO, C.D., BLANC, ACB, DRUILHE, P. (2009). Anticorpos Anti-MSP1 Bloco 2 São Efetivos na Matança de Parasitas de Maneira Específica de Alelo por Inibição Celular Dependente de Anticorpo Mediada por Monócitos, *The Journal of Infectious Diseases* , Volume 199, Edição 8, pg 1151–1154.
29. GIBSON, HL; TUCKER, JE; KASLOW, DC; KRETTLI, AU; COLLINS, E; KIEFER, MC; BATHUST, LC; BARR, PJ. (1992). Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 50: 325-34.
30. GOOD, MF; DOOLAN, DL. (2010). Malaria vaccine design: immunological considerations. *Immunity* 33(4):555-66.
31. HEMINGWAY J, SHRETTA R, WELLS TNC, BELL D, DJIMDÉ AA, ACHEE N, et al. Tools and Strategies for Malaria Control and Elimination: What Do We Need to Achieve a Grand Convergence in Malaria? *PLoS Biol.* [Internet]. 2016;14:1–14.
32. HOWES RE, BATTLE KE, MENDIS KN, SMITH DL, CIBULSKIS RE, BAIRD JK, HAY SI. (2016). Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Dec 28;95(6 Suppl):15-34. doi: 10.4269/ajtmh.16-0141. PubMed PMID: 27402513; PubMed Central PMCID: PMC5198891.
33. JOUIN H, GARRAUD O, LONGACRE S, BALEUX F, MERCEREAU-PUIJALON Ó, MILON L. (2001). Fixed, epitope-specific, cytophilic antibody response to the polymorphic block 2 domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSP-1 in humans living in a malaria-endemic area. *European journal of immunology*, v. 31, n. 2, p. 539-550.
34. JONGWUTIWES, S.; PUTAPORNTIP, C.; HUGHES, A. L.(2010). Bottleneck effects on vaccine-candidate antigen diversity of malaria parasites in Thailand. *Vaccine*, v. 28, n. 18, p. 3112-3117.
35. KUMAR R, SARAVU K. (2017). Severe vivax malaria: a prospective exploration at a tertiary healthcare centre in Southwestern India. *Pathog Glob Health* 111:148–60.
36. LANGHORNE J; NDUNGU FM; SPONAAS AM, MARSH K. (2008). Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology*. 9:725–732. 2008.
37. LAPORTA GZ, BURATTINI MN, D LEVY, FUKUYA LA, TMP DE OLIVEIRA, MASELLI LMF. (2015). *Plasmodium falciparum* no sudeste da Mata Atlântica: um desafio ao paradigma da bromélia-malária? *Malar J.* 14: 181.
38. LY A.; HANSEN DS (2019). Development of B Cell Memory in Malaria. *Front. Immunol.* 10:559. doi: 10.3389/fimmu.2019.00559

39. LOY DE, LIU W, LI Y, LEARN GH, PLENDERLEITH LJ, SUNDARARAMAN SA, SHARP PM, HAHN BH (2017). Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Int J Parasitol* 47: 87–97.
40. MARSH K, KINYANJUI S. (2006). Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*: 28:51–60.
41. MCCALL MB, SAUERWEIN RW. (2010). Interferon- $\gamma$ : central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *Journal of Leukocyte Biology* 88: 1131-1143. 2010.
42. MCKENZIE FE, JEFFERY GM, COLLINS WE.(2002). *Plasmodium vivax* blood-stage dynamics. *J Parasitol*. 88:521–535.
43. MENDIS, K; SINA, BJ; MARCHESINI, P; CARTER, R. (2001). The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 64: 97-106
44. MILLER LH, ROBERTS T, SHAHABUDDIN M, MCCUTCHAN TF. (1993) Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol. Biochem. Parasitol*. [Internet]. 1993;59:1–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8515771>
45. MO AX, MCGUGAN G. (2018). Understanding the Liver-Stage Biology of Malaria Parasites: Insights to Enable and Accelerate the Development of a Highly Efficacious Vaccine. *Am J Trop Med Hyg*. 99(4):827–832.
46. MUELLER I, GALINSKI MR, BAIRD JK, JM CARLTON, KOCHAR DK, ALONSO PL, DEL PORTILLO H. (2009). Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet infectious diseases*, v. 9, n. 9, p. 555-566.
47. NOGUEIRA, PA; ALVES, FP; FERNANDEZ-BECERRA, C; PEIN, O; SANTOS, NR; PEREIRA DA SILVA, LH; CAMARGO, EP; DEL PORTILLO, HA. (2006). A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. *Infection and immunity* .
48. NORANATE, N; PRUGNOLLE, F; JOUIN, H; TALL, A; MARRAMA, L; SOKHNA, C; EKALA, MT; GUILLOTTE, M; BISCHOFF, E; BOUCHIER, C; PATARAPOTIKUL, J; OHASHI, J; TRAPE, J-F; ROGIER, C; MERCEREAU-PUIJALON, O. (2009). Population diversity and antibody selective pressure to *Plasmodium falciparum* MSP1 block2 locus in an African malaria-endemic setting. *BMC Microbiology* 9: 1471-2180.
49. OLLIARO PL, BARNWELL JW, BARRY A, MENDIS K, MUELLER I, REEDER JC, SHANKS GD, SNOUNOU G, WONGSRICHANALAI C. (2016). Implications of *Plasmodium vivax* Biology for Control, Elimination, and Research. *Am J Trop Med Hyg*.
50. OMER, FM; DE SOUZA, JB; CORRAN, PH; SULTAN, AA; RILEY, EM. Activation of transforming growth factor beta by malaria parasite-derived metalloproteinases and a thrombospondin-like molecule. *Journal of Experimental Medicine* 198(12):1817-27, 2003.
51. OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. Situação Epidemiológica: Malária 2009. Disponível em: <http://www.new.paho.org/bra/index.php>. Acesso em: 20/12/2018.
52. Persson, K. E. (2010) Erythrocyte invasion and functionally inhibitory antibodies in *Plasmodium falciparum* malaria. *Acta Trop*. 114, 138–143.

53. POLLEY, SD; TETTEH, KK; CAVANAGH, DR; PEARCE, RJ; LLOYD, JM; BOJANG, KA; OKENU, DM; GREENWOOD, BM; MCBRIDE, JS; CONWAY, DJ. Repeat sequences in block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are targets of antibodies associated with protection from malaria. *Infectious Immunity* 71(4):1833-1842, 2003.
54. PRICE, RN; TIJITRA, E; GUERRA, CA; YEUNG, S; WHITE, NJ; ANSTEY, NM.(2007) *Vivax malaria: Neglected and not benign*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77(6):79–87, 2007.
55. PRICE RN, DOUGLAS NM, ANSTEY NM (2009) New developments in *Plasmodium vivax* malaria: Severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis* 22: 430–435.
56. PUTAPORNTIP, C; JONGWUTIWES, S; SAKIHAMA, FERREIRA, MU; KHOLL, WEON-GYU; KANEKO, A; KANBARA, H; HATTORI, T; TANABE, K. (2002). Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(25): 16348-353.
57. SABCHAREON, A; BURNOUF, T; OUATTARA, D; ATTANATH, P; BOUHAROUN-TAYOUN, H; CHANTAVANICH, P; FOUCAULT, C; CHONGSUPHAJAISIDDHI, T; DRUILHE, P. (1991). Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45(3): 297-308.
58. SCHWENK RJ; RICHIE TL. (2011). Protective immunity to pre-erythrocytic stage malaria. *Trends Parasitology* (7):306-14.
59. Sivep-malária 2018. Dados dos casos de malária em 2017 obtidos pelo sistema de informação epidemiológica (Sivep-Malária) do Ministério da Saúde no Brasil.
60. SOARES IS, LEVITUS G, SOUZA JM, DEL PORTILLO H A.(1997). Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect. Immun*;65:1606–14.
61. SOARES IS, CUNHA MG, SILVA MN, SOUZA JM, DEL PORTILLO H A, RODRIGUES MM. (1999). Longevity of the naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* MSP1. *Am J Trop Med Hyg.*;60:357–63.
62. Soares LA, Evangelista J, Orlandi PP, Almeida ME, de Sousa LP, Chaves Y, Barbosa-Filho R, Lacerda MV, Mariuba LA, Nogueira PA. (2014). Genetic diversity of MSP1 Block 2 of *Plasmodium vivax* isolates from Manaus (central Brazilian Amazon). *J Immunol Res*.
63. SOWA, KMP; CAVANAGH, DR; CREASEY, AM; RAATS, J; MCBRIDE. JS; SAUERWEIN, R; ROEFFEN, WF; ARNOT, DE. (2001). Isolation of a monoclonal antibody from a malaria patient-derived phage display library recognising the Block 2 epitope of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1. *Molecular & Biochemical Parasitology* 112: 143-149.
64. STEVENSON MM; RILEY EM.(2004). Innate immunity to malaria. *Nature immunology*; 4: 169-180.
65. STEVENSON MM, ING R, BERRETTA F, MIU J.(2011). Regulating the adaptive immune response to blood-stage malaria: role of dendritic cells and CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *International Journal Biology Science*.7 (9):1311-22.

66. TANABE, K; MACKAY, M; GOMAN, M; SACIFE, JG. (1987). Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biological Evolution* 9: 381–393.
67. TAVARES J, FORMAGLIO P, THIBERGE S, MORDELET E, VAN ROOIJEN N, MEDVINSKY A, MÉNARD R, AMINO R. (2013). Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *J Exp Med*. 2013 May 6;210(5):905-15.
68. TEO A, FENG G, BROWN GV, BEESON JG & ROGERSON SJ (2016) Functional antibodies and protection against blood-stage malaria. *Trends Parasitol* 32, 888–898
69. VERSIANI FG, ALMEIDA ME, MELO GC, VERSIANI FO, ORLANDI PP, et al. (2013a) High levels of IgG3 anti ICB2-5 in *Plasmodium vivax*-infected individuals who did not develop symptoms. *Malar J* 12: 294.
70. VERSIANI FG, ALMEIDA ME, MARIUBA LA, ORLANDI PP, NOGUEIRA PA.(2013b). N-terminal *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1, a potential subunit for malaria vivax vaccine. *Clin Dev Immunol*.
71. WHO | World Malaria Report 2014. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/)>. Acesso em: 25 ago. 2015.
72. WHO | World Malaria Report 2015. Disponível em: <[http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2015/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2015/en/)>. Acesso em: 25 abr. 2016.
73. WHO | World Malaria Report 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>>. Acesso em: 23 març 2019.
74. WILSON KL, XIANG SD, PLEBANSKI M. A. (2016). Model to Study the Impact of Polymorphism Driven Liver-Stage Immune Evasion by Malaria Parasites, to Help Design Effective Cross-Reactive Vaccines. *Front Microbiol*. 11;7:303.
75. YAZDANI, SS; MUKHERJEE, P; CHAUHAN, VS; CHITNIS, CE. (2003). Immune responses to asexual blood-stages of malaria parasites. *Current Molecular Medicine* 6:187