

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Instituto René Rachou**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Antígeno sintético baseado na *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax*:  
perfil de expressão gênica associado com a resposta imune de longa duração  
em indivíduos da Amazônia brasileira**

por

**Sâmick Layene Moreira Nascimento**

Belo Horizonte

2022

DISSERTAÇÃO MSC - CPqRR S.L.M.NASCIMENTO 2022

**SÂMICK LAYENE MOREIRA NASCIMENTO**

**Antígeno sintético baseado na *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax*:  
perfil de expressão gênica associado com a resposta imune de longa duração  
em indivíduos da Amazônia brasileira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dr<sup>a</sup>. Flora Satiko Kano  
Coorientação: Dr<sup>a</sup>. Luzia Helena Carvalho

Belo Horizonte

2022

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB 6 3740/00

N17a  
2022

Nascimento, Sâmick Layene Moreira.

Antígeno sintético baseado na Duffy binding protein de *Plasmodium vivax*: perfil de expressão gênica associado com a resposta imune de longa duração em indivíduos da Amazônia brasileira / Sâmick Layene Moreira Nascimento. – Belo Horizonte, 2022

XVI, 106 f., il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 86-100

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação do Centro de Pesquisas do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias

1. *Plasmodium vivax*/imunologia. 2. Expressão gênica/imunologia. 3. Imunidade inata/efeitos dos fármacos. 4. Imunidade adaptativa/imunologia. I. Título. II. Kano, Flora Satiko (Orientação). III. Carvalho, Luzia Helena (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.93

## **SÂMICK LAYENE MOREIRA NASCIMENTO**

**Antígeno sintético baseado na *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax*:  
perfil de expressão gênica associado com a resposta imune de longa duração  
em indivíduos da Amazônia brasileira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Flora Satiko Kano (IRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dra. Lilian Rose Pratt Riccio (IOC/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Andrea Teixeira de Carvalho (IRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Isabela Penna Cerávolo (IRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 05/07/2022

*Aos que sofrem, ou um dia sofreram, com malária.*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer, primeiramente a Deus, por me iluminar, acalmar meu coração diante das dificuldades e por sempre me mostrar o melhor caminho a seguir

À minha orientadora, Dra. Flora Kano, pela oportunidade e confiança. Obrigada por me auxiliar nesse início de caminhada com tanta paciência, persistência e por acreditar na minha capacidade de evoluir;

Também, à Dra. Luzia Carvalho, minha coorientadora, pelas excelentes discussões e outras tantas colaborações intelectuais.

Aos nossos colaboradores, Dra. Taís Nóbrega e Dr. Roney Coimbra, que foram essenciais para a realização deste trabalho. Obrigada pela infinita paciência e disposição de sempre.

Aos inúmeros professores, internos e externos ao IRR, que também fizeram parte da minha formação durante as mais diversas disciplinas;

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, pela oportunidade;

Às Plataformas de PCR em tempo real e Sequenciamento NGS, e ao Laboratório Multiusuário de produção de recombinantes (PROREC), pelo fornecimento da infraestrutura. Em especial, à Viviane Santos, Anna Salim, Flávio Araújo e Neviton Neves, pela disposição e auxílio nos experimentos;

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz Amazônia) por todo suporte durante a realização do trabalho de campo.

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho. Em especial, à FAPEMIG pelo fornecimento da minha bolsa de mestrado e projeto aprovado, e às demais agências NIH, CNPq, CAPES e Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP) do IRR/FIOCRUZ, pela infraestrutura

e recursos

A todos os habitantes de Rio Pardo, que com sua boa vontade e simpatia tornaram esse estudo possível, agradeço por nunca deixarem de colaborar e acreditar em nosso trabalho;

A todos os membros do BMIM, pela convivência, aprendizagem juntos e por sempre estarem disponíveis a ajudar. Em especial aos amigos que fiz durante essa caminhada. Obrigada por todos os momentos de diversão (dentro e fora da instituição), pelo aprendizado cotidiano e por me fazerem evoluir como ser humano através da convivência diária. Sem vocês não teria sido metade do que foi;

À minha família e amigos, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando incondicionalmente. Obrigada pela paciência, e por toda a força que me deram nos momentos mais difíceis. Os momentos compartilhados com vocês são muito especiais e me dão um suporte inimaginável

## RESUMO

A invasão dos eritrócitos pelo *Plasmodium spp* é essencial para o sucesso da infecção humana e está associada com a forma clínica da malária. A proteína de ligação ao antígeno Duffy – domínio II (DBPII) é uma das principais candidatas à vacina contra a malária por *P. vivax*. No entanto, a existência de polimorfismos na DBPII induz frequentemente imunidade do tipo alelo-específica. No intuito de se obter uma resposta de anticorpos anti-DBPII de ampla reatividade, construções têm sido obtidas para direcionar a resposta imune contra epítomos conservados da DBPII, como é caso da DEKnull-2. No presente estudo avaliamos o perfil da resposta de anticorpos contra DBPII e DEKnull-2 no inquérito transversal realizado no 11<sup>o</sup> ano do estudo longitudinal, bem como a dinâmica da resposta imune humoral contra estes antígenos durante o período de acompanhamento. Em seguida, avaliamos a expressão gênica de ativação de células T e B associada com a resposta imune contra DBPII e DEKnull-2 de longa duração com base em um estudo longitudinal de 11 anos de acompanhamento. A persistência de anticorpos contra DBPII e DEKnull-2 foram avaliados por sorologia convencional em conjunto com anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC (BIAbs). Em seguida, o perfil da expressão de genes envolvidos na ativação de células T e B específicas para DEKnull-2 e DBPII-Sal1 foi avaliado por ensaio de Taqman OpenArray. Ao todo, 210 indivíduos participaram da corte transversal, sendo 52% novos participantes (NP) e 48% antigos participantes (AP). A frequência da resposta de anticorpos IgG foi maior em AP em comparação com NP para ambas as proteínas (DBPII e DEKnull-2). A frequência da resposta contra DBPII variou ao longo do estudo, onde houve uma queda da positividade de 34% para 16% durante o período de baixa transmissão de malária. Por outro lado, a frequência da resposta de anticorpos IgG contra a DEKnull-2 permaneceu estável, em torno de 30%, durante o período avaliado. A partir do perfil da resposta de anticorpos IgG total e BIAbs, os AP foram classificados em respondedores de elite (RE) e não respondedores persistentes (NR). Pela avaliação do perfil de expressão gênica de ativação de células T e B identificamos sete genes diferencialmente expressos (DEGs) sob estímulo de DEKnull-2 (TLR4, IL7, CD8B, IRF8, CD2, IL6, CD276) e apenas um DEG (CD8B) para DBPII, onde a maioria dos genes foram regulados positivamente em RE. O enriquecimento funcional dos DEGs mostrou sete vias canônicas significativamente enriquecidas apenas sob o estímulo da DEKnull-2. Os resultados aqui encontrados mostram que DEKnull-2 induz uma resposta de anticorpos de maior estabilidade que a DBPII, reforçando seu potencial como candidato vacinal. Além disso, respondedores de elite parecem ativar vias relacionadas com o desenvolvimento de uma resposta imune inata e adaptativa, dos quais participam genes envolvidos na interação de células T e B.

**Palavras-chave:** *Plasmodium vivax*, DBPII, DEKnull-2, expressão gênica, imunidade inata, imunidade adaptativa.

## ABSTRACT

Invasion of erythrocytes by *Plasmodium* spp is essential for successful human infection and is associated with clinical malaria. The region II of Duffy antigen binding protein of *P. vivax* (DBPII) is one of the major vaccine candidates against *P. vivax* malaria. However, the presence of polymorphisms in DBPII often induces allele-specific immunity. To overcome the polymorphisms and induce transcending anti-DBPII antibody response, synthetic prototype based on DBPII have been constructed to target conserved epitopes, named DEKnull-2. In the present study, we evaluated the antibody response against DBPII and DEKnull-2 at cross-sectional survey performed in the 11th year of the longitudinal study, as well as the dynamics of the humoral immune response against these antigens during the follow-up study. Next, we evaluated the T and B cell activation gene expression associated with long-lasting immune response against DBPII and DEKnull-2 based on the 11-year follow-up study. The persistence of antibodies against DBPII and DEKnull-2 were evaluated based on total IgG, detected by conventional serology, and neutralizing antibodies of the DBPII-DARC interaction (BIAbs). Next step, gene expression profile of T and B cells activation stimulated with DEKnull-2 and DBPII-Sal1 was evaluated by Taqman OpenArray assay. Overall, 210 individuals enrolled at the cross-sectional study, who are 52% new participants (NP) and 48% followed participants (AP). The frequency of IgG antibody response was higher in AP compared to NP for both DBPII and DEKnull-2. Moreover, frequency of antibody response against DBPII varied during the followed-up study, where the proportion of responder dropped from 34% to 16% during low malaria transmission period. On the other hand, the seropositivity of IgG against DEKnull-2 remained stable, around 30%, during the study. Based on the total IgG response and BIAbs response, AP were classified into elite responders (RE) and non-responders (NR). According to the gene expression profile of T and B cells activation, seven differentially expressed genes (DEGs) under DEKnull-2 stimulation were identified (TLR4, IL7, CD8B, IRF8, CD2, IL6, CD276) and only one DEG (CD8B) stimulated with DBPII. Most of the genes were upregulated in ER. Functional enrichment of DEGs identified seven canonical pathways significantly enriched under stimulation with DEKnull-2. Taken together, the results showed DEKnull-2 induces stable and long-lived antibody response compared to DBPII, reinforcing its potential as a *P. vivax* vaccine candidate. In addition, elite responders seem to activate pathways involved in the development of an innate and adaptive immune responses, that genes are involved in the T and B cells interaction.

**Keywords:** *Plasmodium vivax*, DBPII, DEKnull-2, gene expression, innate immunity, adaptive immunity.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Representação esquemática do ciclo biológico do <i>Plasmodium vivax</i> .....  | 19 |
| <b>Figura 2:</b> Representação do processo de invasão pelo <i>Plasmodium sp.</i> em eritrócitos e interação molecular do processo de invasão pelo <i>P. vivax</i> .....   | 24 |
| <b>Figura 3.</b> Representação esquemática da ativação de linfócitos B por duas sinalizações e geração de células B de memória de curta e longa duração e células secretoras de anticorpos.....   | 31 |
| <b>Figura 4.</b> Mapa do Brasil na América do Sul mostrando a localização da região endêmica para malária na Amazônia.....  | 39 |
| <b>Figura 5.</b> Distribuição temporal do número de casos de malária por espécie de <i>Plasmodium spp</i> e os respectivos anos de acompanhamento do estudo longitudinal realizados na população de estudo - Rio Pardo.....   | 40 |
| <b>Figura 6.</b> Delineamento experimental do estudo prospectivo na comunidade de Rio Pardo, estado do Amazonas.....  | 41 |
| <b>Figura 7.</b> Frequência de anticorpos IgG total contra os antígenos de <i>P. vivax</i> na população de estudo de Rio Pardo.....   | 55 |
| <b>Figura 8.</b> Dinâmica da resposta de anticorpos antígeno-específicos durante 11 anos de acompanhamento.....   | 56 |
| <b>Figura 9.</b> Perfil individual da resposta de anticorpos IgG total antígeno-específicos de acordo com o <i>status</i> imunológico da resposta de anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC (BIAbs) da população de estudo para avaliação do diferencial da expressão gênica de ativação de células B e T..... | 58 |
| <b>Figura 10.</b> Comparação de quatro protocolos distintos de extração de RNA total a partir de PBMC frescas estimuladas de amostras controles.....  | 61 |
| <b>Figura 11.</b> Avaliação da quantidade e qualidade do RNA extraído antes e após a concentração das amostras em <i>Speed Vacuum</i> .....   | 62 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 12.</b> Avaliação da amplificação dos genes de referência.....  | 65 |
| <b>Figura 13.</b> Mapa de calor representado com os valores de Log <sub>2</sub> RQ dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em indivíduos respondedores de elite (RE) estimulados com DBPII e DEKnull-2..... | 67 |
| <b>Figura 14.</b> Mapa de calor indicando as vias canônicas funcionalmente enriquecidas para respondedores de elite para DEKnull-2.....   | 68 |
| <b>Figura 15.</b> Genes TLR4 e IL-6, codificando a produção da citocina pró-inflamatória IL-6.....  | 74 |
| <b>Figura 16.</b> Genes IRF8 e CD276, regulando a produção de IFN- $\gamma$ .....   | 76 |
| <b>Figura 17.</b> Gene IL-7 codificando a produção de IL-7, principal citocina associada ao desenvolvimento de LTfh e LB.....   | 77 |
| <b>Figura 18.</b> Genes down-regulated em Respondedores de Elite.....   | 79 |
| <b>Figura 19.</b> Genes TLR4 e IL-6 atuando na ativação das vias de sinalização TREM-1 e ativação de receptor X hepático LXR/RXR.....   | 80 |
| <b>Figura 20.</b> Genes IL-6, IL-7 e CD8B participando da ativação da via da hematopoiese a partir de células-tronco pluripotentes de longo prazo.....  | 82 |
| <b>Figura 21.</b> Ativação da via JAK/STAT3 a partir do aumento da expressão do gene IL-6, responsável pela codificação da citocina IL-6.....   | 83 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Alvos de ativação de células T e B avaliados na análise do perfil de expressão gênica pelo ensaio de <i>Open Array</i> .....   | 50 |
| <b>Tabela 2.</b> Características demográficas, epidemiológicas e infecção malárica da população do estudo.....  | 54 |
| <b>Tabela 3.</b> Características demográficas, epidemiológicas e de infecção malárica nos indivíduos selecionados para avaliação do perfil de expressão gênica de ativação de células T e B.....          | 59 |
| <b>Tabela 4.</b> Concentração do RNA extraído (ng/□L) e número de integridade de RNA (RIN) em amostras não concentradas e concentradas pelo <i>Speed Vacuum</i> obtidas de PBMC de amostras controle..... | 63 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AMA-1** - Antígeno 1 de membrana apical (*Apical membrane antigen 1*)
- AP**- Antigos participantes
- AP-1**- Proteína ativadora 1
- atBCs** - células B típicas
- BCR** - Receptores de células B
- BIAbs** - Anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC
- CG** - Centros germinativos
- CRT** - *Relative threshold cycles*
- CTH** - Células-tronco hematopoéticas
- CTH-CP** - Células-tronco hematopoéticas de curto prazo
- CTH-LP** - Células-tronco hematopoéticas de longo prazo
- CTL** - Linfócito T citotóxico
- DARC** - Antígeno do grupo sanguíneo Duffy/receptor para quimiocinas (*Duffy Antigen/Chemokine Receptor*)
- DBP** - *Duffy binding protein*
- DCs** - Células Dendríticas
- DEGs** - Genes diferencialmente expressos
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- EBL** - Erythrocyte binding-like
- EBP2** - Erythrocyte binding protein 2
- ELISA** - Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**FOS: JUN** - Proto-Oncogene

**gDNA** - DNA genômico

**GFP**- Green fluorescent Protein

**GM-CSF** - *Colony Stimulating Factor*

**GPI** – *Glicosil Fosfatidilinositol*

**IC** - Imunidade clínica

**IFN** - Interferon

**IFN- $\gamma$**  - Interferon- $\gamma$

**IgG** - Imunoglobulina da classe G

**INA** - Imunidade naturalmente adquirida

**INCRA** - Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária

**IPA** - *Ingenuity Pathway Analysis*

**IR** – Índice de reatividade

**JAK** - *Janus Kinase*

**LXR** - *The liver X receptor*

**MBC** - Células B de memória

**MHC** - Moléculas co-estimulatórias e do complexo de histocompatibilidade

**MSP1-19** - Fragmento C-terminal de 19kDa da proteína principal de superfície do merozoíto

**NK** - Natural Killer

**NO** - Óxido nítrico

**NP** - Novos participantes

**NR** - Não respondedores

**OPD** - Ortofenilenodiamina

**PAMPs** - Padrões moleculares associados a patógenos

**PbA** - *P. berghei* ANKA

**PBMC** - *Peripheral blood mononuclear cell*

**PC** - Plasmócitos

**PCA** - Análise de componente principal

**Pv** - *Plasmodium vivax*

**qPCR** - Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real

**RBP2b** - *Reticulocyte-binding protein 2b*

**RE** - respondedores de elite

**RELA** - RELA Proto-Oncogene

**RIN** - *RNA Integrity Number*

**ROS** - Espécies reativas de oxigênio

**RPMI** - Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

**RQ** - Quantificação Relativa

**rRNA** - RNA ribossomal

**RT** - Respondedor transiente à DBPII

**RXR** - *Retinoid X Receptor*

**Sal1** - Variante de DBPII de *P. vivax* de um clone de referência de laboratório isolado em El Salvador

**SFB** – Soro fetal bovino

**SIVEP** - Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica

**STAT** - *Signal Transducer And Activator Of Transcription*

**TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Tfh** - Celulas T foliculares auxiliares

**Tfh** - Linfócitos T auxiliares foliculares

**TfR1** - Transferrina 1

**TLRs** - Receptores Toll

**TNF $\alpha$**  - *Tumor Necrosis Factor*

**TREM1** - *Triggering receptor expressed on myeloid cells 1*

**USGS** - *U.S. Geological Survey*

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | <b>17</b> |
| 1.1 Malária no mundo e no Brasil  | 17        |
| 1.2 Agente etiológico e ciclo biológico da malária  | 18        |
| 1.3 Processo de invasão dos eritrócitos pelo Plasmodium vivax   | 21        |
| 1.4 Duffy Binding Protein (DBP) de P. vivax   | 23        |
| 1.5 Antígenos sintéticos baseados na DBPII – DEKnull e DEKnull2   | 26        |
| 1.6 Resposta imune à malária  | 28        |
| 1.6.1 Imunidade inata   | 28        |
| 1.6.2 Imunidade naturalmente adquirida  | 30        |
| 1.6.3 Resposta transcricional do hospedeiro na imunidade à malária  | 32        |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b>   | <b>36</b> |
| <b>3. OBJETIVOS</b>   | <b>37</b> |
| 3.1 Objetivo Geral  | 37        |
| 3.2 Objetivos Específicos   | 37        |
| <b>4. MATERIAIS E METODOS</b>   | <b>38</b> |
| 4.1 Área e população de estudo  | 38        |
| 4.1.1 Desenho experimental do estudo longitudinal   | 39        |
| 4.2 Coleta de amostras e Processamento  | 42        |
| 4.2.1 Obtenção de plasma e isolamento de células mononucleares do sangue periférico ( <i>peripheral blood mononuclear cell</i> – PBMC)  | 42        |
| 4.3 Antígenos de P. vivax recombinantes   | 42        |
| 4.4 Detecção de anticorpos IgG total específicos pela sorologia convencional  | 43        |
| 4.5 Detecção de anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC (BIAbs) pelo ensaio funcional de COS-7  | 44        |
| 4.6 Cultura de PBMCs estimuladas com antígenos de P. vivax  | 44        |
| 4.7 Avaliação do perfil de expressão gênica   | 45        |
| 4.7.1 Padronização da Extração de RNA   | 45        |
| 4.7.2 Quantificação e análise da qualidade do RNA extraído  | 47        |
| 4.7.3 Transcrição reversa para obtenção de cDNA e pré-amplificação  | 47        |
| 4.7.4 Ensaio OpenArray  | 48        |
| 4.8 Análise estatística   | 51        |
| <b>5. RESULTADOS</b>  | <b>53</b> |
| 5.1 Características gerais da população do estudo   | 53        |
| 5.2 Frequência de anticorpos IgG contra DBPII Sal-1 e DEKnull-2 na população do estudo  | 54        |
| 5.3 Perfil de Resposta de anticorpos IgG totais antígeno-específicos de acordo com o status imunológico da resposta de anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC (BIAbs) de longa duração | 57        |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 5.4       | Avaliação do perfil diferencial de expressão gênica de ativação de células T e B pelo ensaio de <i>Taqman Open Array</i> .....                          | 60         |
| 5.4.1     | Escolha do protocolo da extração de RNA a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) .....   | 60         |
| 5.4.2     | Inclusão da etapa de pré-amplificação do cDNA para o ensaio de expressão gênica .....   | 63         |
| 5.4.3     | Avaliação do diferencial de expressão gênica de ativação de células T e B em respondedores de elite e não respondedores. ....                           | 66         |
| <b>6.</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | <b>69</b>  |
| 6.1       | Perfil da resposta imune humoral contra DBP11 e DEKnull-2 em um estudo longitudinal de longa duração em indivíduos de área endêmica para a malária .... | 69         |
| 6.2       | Perfil de expressão de genes relacionados com a ativação de células T e B em Respondedores de Elite .....   | 71         |
| <b>7.</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | <b>85</b>  |
| <b>8.</b> | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>86</b>  |
|           | <b>ANEXO 1- Termo de consentimento livre e esclarecido assinado por todos os participantes do estudo</b> .....  | <b>101</b> |
|           | <b>ANEXO 2- Questionário aplicado aos indivíduos participantes do estudo.....</b>   | <b>104</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Malária no mundo e no Brasil

Apesar dos esforços para controle e eliminação, a malária ainda é uma das principais doenças parasitárias no mundo (WHO, 2021). O impacto global referente aos danos sociais e econômicos causados pela malária é extenso, sendo uma das doenças de maior impacto na morbidade e mortalidade da população dos países situados nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (WHO, 2021; SVS, 2020). Segundo a Organização Mundial de Saúde, 241 milhões de casos de malária foram notificados no mundo em 2020 (OMS, 2021), com aproximadamente 627 mil mortes. Aproximadamente dois terços dessas mortes foram relacionadas a interrupções na prestação de prevenção, diagnóstico e tratamento da malária durante a pandemia da COVID-19 (WHO, 2021).

No continente americano, a malária é endêmica em 27 países e cerca de 138 milhões de pessoas vivem sob o risco de contrair a doença (PAHO, 2021). No Brasil, a região da Amazônia Legal, constituída pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, é considerada endêmica para malária. Nesta área, concentra-se 99% dos casos de malária registrados em todo o país (FARIA, LUZ e BETIN, 2019; SVS, 2020). Contudo, o perfil de transmissão da doença na Amazônia é heterogêneo e instável, e a maioria da população exposta é composta por imigrantes de regiões não endêmicas para malária no Brasil (CAMARGO et al., 1994). No entanto, a partir de 2000 com os programas de incentivo ao desenvolvimento da região Amazônica, como os programas de assentamento agrícola, proporcionaram mudanças socioambientais colocando a população não imune em risco de infecção de malária (DE CASTRO et al., 2006).

Em 2015 foram notificados 143 mil casos da doença no país, o que representou uma redução de 89% dos casos em 15 anos (2000-2015) (PENIDO, 2016). A redução do número de casos de malária foi atribuída aos esforços de controle implementados pelo Ministério da Saúde, que objetivaram a redução da mortalidade e incidência da doença, eliminação da

transmissão em áreas urbanas e manutenção da ausência da transmissão em locais onde a doença foi interrompida (SVS, 2007). Para isso, o foco foi direcionada ao diagnóstico e tratamento precoce e oportuno dos infectados ampliando o número de postos de atendimento pela Amazônia, bem como a intensificação de borrifação intradomiciliar com inseticidas (SVS, 2009).

Contudo, apesar das medidas de controle de transmissão de malária, diversos fatores têm dificultado o controle da doença no país, como os garimpos (ALVES, 2012). De fato, observou-se um aumento de 15% dos casos de malária em área indígena no Brasil, impulsionados principalmente por um aumento de 56% dos casos associados ao garimpo em 2019 e 2020 (SVS, 2021). Além dos garimpos, a construção de hidrelétricas, rodovias e assentamentos agrícolas (TADEI e DUTARY-THATCHER, 2000; SANTOS et al., 2009), também dificultaram o controle da doença, estimulando não somente a migração e a ocupação irregular de territórios tradicionais, mas levando a alterações no ambiente físico promovendo a formação de criadouros para o mosquito vetor e facilitando o contato entre o vetor e os seres humanos (TAUIL et al., 1985). Além disso, os casos de infecção assintomática e a expansão de parasitos resistentes às drogas antimaláricas também constituem desafios no controle da malária no Brasil (LAPOUBLE et al., 2015; FERREIRA e CASTRO, 2016; ALMEIDA et al., 2016).

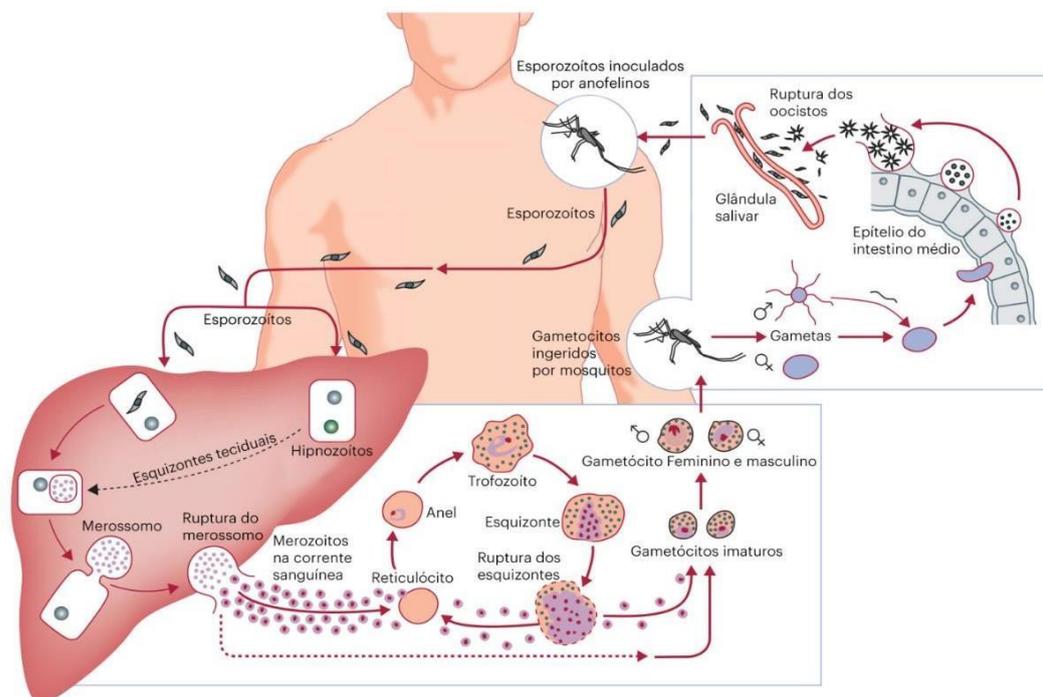
## 1.2 Agente etiológico e ciclo biológico da malária

A malária é causada por protozoários do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Atualmente, seis espécies podem causar a doença no homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. simium* e *P. knowlesi*. Esses apicomplexas ocorrem em diferentes formas em vários tecidos, incluindo fígado, sangue, baço e medula óssea (BRITO et al., 2020; MALLERET et al., 2015). Das espécies que causam a malária em humanos, *P. falciparum* e *P. vivax* são as espécies mais prevalentes, sendo o *P. falciparum* responsável pela maioria dos casos graves, enquanto o *P. vivax* é a espécie que possui maior distribuição geográfica fora do continente Africano, representando 77% dos casos registrados nas Américas (OMS,

2020). No Brasil, 84% dos casos de malária notificados são causados por essa espécie (SVS, 2021).

O ciclo biológico de *P. vivax* compreende duas fases distintas: uma no hospedeiro invertebrado, as fêmeas de mosquitos anofelinos, e a outra no hospedeiro vertebrado, o homem (Figura 1). No homem, a infecção se inicia quando os esporozoítos, formas infectantes do *Plasmodium* spp, são inoculados sob a pele pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. Após serem inoculados na derme, formas alongadas e móveis do *Plasmodium* (esporozoítos), movimentam-se rapidamente e atingem a corrente sanguínea. Posteriormente, alcançam o fígado e invadem os hepatócitos iniciando o ciclo hepático da infecção ou extra-eritrocítico. No interior dos hepatócitos, ocorre a formação de um vacúolo parasitóforo, onde os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos (HOLZ *et al.*, 2016; CROMPTON *et al.*, 2014; MEIBALAN e MARTI, 2016).

**Figura 1-** Representação esquemática do ciclo biológico do *Plasmodium vivax*.



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

Após sucessivas divisões celulares, chamadas esquizogonia, ocorre a formação dos esquizontes teciduais, os quais amadurecem e liberam os merozoítos diretamente na corrente sanguínea por meio de brotamento de

vesículas, denominadas merossomos, ou ainda, no caso do *P. ovale* e *P. vivax*, pode ocorrer a diferenciação em um estágio dormente chamado hipnozoíto (STURM *et al.*, 2006). Os hipnozoítos podem ser reativados após meses ou anos, levando a recaídas de episódios agudos da malária (PINZON-CHARRY *et al.*, 2013; SPONAAS *et al.*, 2009).

Os merozoítos de *P. vivax* liberados na circulação, por sua vez, invadem os eritrócitos, preferencialmente os reticulócitos jovens (CD17<sup>high</sup>) que são prevalentes no parênquima da medula óssea (MALLERET *et al.*, 2015). O processo de invasão de reticulócitos pelo parasito ocorre por meio de sucessivas interações específicas do tipo receptor-ligante, ou seja, entre receptores expressos na superfície dos reticulócitos e proteínas do parasito (COWMAN e CRABB, 2006; PETTER e DUFFY, 2015). Na fase eritrocítica do ciclo, o parasito se replica assexuadamente dentro dos eritrócitos, formando os esquizontes sanguíneos que, quando maduros se rompem liberando milhares de novos merozoítos que irão infectar novos eritrócitos. Nessa fase, as moléculas geradas pelo parasito e a lise dos eritrócitos induzem uma resposta inflamatória, responsáveis pelos sintomas clínicos observados na infecção malárica, como febre, dor de cabeça, calafrios, náusea e fraqueza (BAIRD, 2013). Após sucessivos ciclos de replicação nas células vermelhas, ocorre o desenvolvimento de formas sexuadas, os gametócitos femininos e masculinos, que são as formas infectantes para o mosquito vetor (SINDEN, 2009).

Os gametócitos, quando são ingeridos pela fêmea do anofelino durante o repasto sanguíneo, dão início à fase sexuada do ciclo. No intestino médio do mosquito vetor, os gametócitos femininos e masculinos amadurecem e se fecundam formando um zigoto diplóide (VLACHOU *et al.*, 2006). Posteriormente, há o desenvolvimento em oocinetos móveis, oocistos e esporozoítos que migram até as glândulas salivares, onde se maturam para a forma de esporozoítos infectantes, estando aptos para serem transmitidos para o hospedeiro vertebrado, completando assim o ciclo de vida dos plasmódios (CROMPTON *et al.*, 2014; MEIBALAN e MARTI, 2016).

### 1.3 Processo de invasão dos eritrócitos pelo *Plasmodium vivax*

O processo de invasão dos eritrócitos pelo *Plasmodium sp* é complexo e envolve diversas etapas compostas por sucessivas interações específicas do tipo ligante-receptor entre as proteínas do parasito e receptores expressos na superfície dos eritrócitos. No geral, o processo de invasão compreende três fases: (1) adesão – envolve ligação de baixa afinidade e reversível entre o merozoíto e a membrana do eritrócito; (2) reorientação e formação da junção irreversível – propicia o contato entre o complexo apical do parasito e a membrana do eritrócito, seguida da liberação do conteúdo de micronema do parasito; (3) invasão do parasito nos eritrócitos – formação do vacúolo parasitóforo, no qual o merozoíto irá se desenvolver (Figura 2A) (BEESON e CRABB, 2007; COWMAN e CRABB, 2006).

Embora o mecanismo geral de invasão de plasmódios nas células vermelhas do sangue seja semelhante, há particularidades entre as duas espécies *P. falciparum* e *P. vivax*, que são de maior importância do ponto de vista em saúde pública. Diferentemente de *P. falciparum*, o *P. vivax* invade preferencialmente, se não exclusivamente, os reticulócitos (eritrócitos imaturos). Além disso, enquanto que *P. falciparum* utiliza diversas vias de invasão em eritrócitos (PETTER e DUFFY, 2015), até o momento para o *P. vivax*, é conhecida uma única via para a etapa de formação da junção irreversível da invasão que envolve a interação entre a proteína *Duffy binding protein* (DBP) de micronema do parasito, e o receptor para quimiocinas do grupo sanguíneo *Duffy* (DARC - *Duffy Antigen/Chemokine Receptor*), expresso na superfície dos eritrócitos do hospedeiro humano (ADAMS *et al.*, 1990; ADAMS *et al.*, 1992; WERTHEIMER e BARNWELL, 1989).

Devido a importância do processo de invasão dos reticulócitos no estabelecimento da infecção pelos plasmódios, vários trabalhos têm apontado diferentes proteínas envolvidas na invasão dos reticulócitos como potenciais candidatas à vacina. O fragmento C-terminal de 19kDa da proteína principal de superfície do merozoíto (MSP1-19) é bastante imunogênica (SOARES *et al.*, 1999) e tem sido muito estudada. Um estudo sobre a resposta imune

humoral contra a MSP1-19 em residentes de áreas de baixa transmissão de *P. vivax* na Tailândia mostrou que esta proteína é capaz de induzir a geração de células B de memória e anticorpos de longa duração mesmo após seis anos na ausência de transmissão de malária (WIPASA et al., 2010). Outros trabalhos também já mostraram que anticorpos produzidos contra esta proteína são capazes de persistirem após longos períodos mesmo na ausência de exposição ao parasito (BRAGA et al., 1998; LIM et al., 2004).

Outra proteína que tem se mostrado promissora como candidata a vacina de *P. vivax* é o antígeno apical de membrana -1 (AMA-1). Esta proteína parece ser essencial no processo de invasão dos gêneros *Plasmodium* e *Toxoplasma* (TYLER et al., 2011). Além disso, já foi descrito que a AMA-1 é naturalmente imunogênica em indivíduos expostos ao *P. vivax* (RODRIGUES et al., 2005), e a imunização em camundongos com essa proteína gerou anticorpos capazes de inibir a invasão dos eritrócitos pelo parasito (VICENTIN et al., 2014), reforçando seu potencial imunogênico. Com base nos estudos de caracterização imune contra MSP1-19 e AMA-1, a proteína quimérica constituída de epítomos imunodominantes da MSP1-19 e AMA- 166 de *P. vivax* mostrou-se vantajoso, pois melhorou os títulos de anticorpos, bem como a resposta celular (ROCHA et al., 2017).

Mais recentemente, foi identificado um novo membro da família *Erythrocyte binding-like (EBL)*, denominado *Erythrocyte binding protein 2 (EBP2)*. A EBP2 se liga preferencialmente a reticulócitos jovens DARC positivos (NTUMNGIA et al., 2016), e além de induzir uma resposta imune de longo prazo (Torres, 2017), ela se mostrou altamente imunogênica em indivíduos com longa exposição à malária (dados não publicados). Outra proteína que se liga ao reticulócito é a *Reticulocyte-binding protein 2b (RBP2b)*, cujo receptor cognato no reticulócito é o receptor da transferrina 1 (TfR1). No processo de invasão, a interação entre a RBP2b e TfR1 é estável e as células deficientes do receptor TfR1 se mostraram refratárias a infecções por *P. vivax* (GRUSZCZYK et al., 2018). Além disso, em humanos os anticorpos contra a RBP2b foram associados com a redução da parasitemia (HIETANEN et al., 2016) e proteção contra a forma clínica da malária (CHIM-ONG et al., 2020).

No entanto, a proteína de fase sanguínea mais promissora para o desenvolvimento de uma vacina contra *P. vivax* é a DBPII, sendo a única proteína em fase de ensaio clínico (PAYNE, et al. 2017; SINGH et al., 201). Além disso, a ligação dessa proteína com o antígeno de grupo sanguíneo Duffy receptor para quimiocinas, o DARC, é a única via da junção irreversível de invasão aos reticulócitos conhecida para o *P. vivax* (MILLER et al., 1976; ADAMS et al., 1992), ou seja, essencial para garantir o parasitismo na célula hospedeira. De fato, indivíduos que não expressam o receptor DARC na superfície dos eritrócitos (DARC negativo) parecem ser naturalmente resistentes à infecção por *P. vivax* (MILLER et al., 1976). Além disso, a DBP é naturalmente imunogênica em indivíduos expostos à malária (CERÁVOLO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; SOUZA-SILVA et al., 2010) e é capaz de induzir anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC, os quais, foram associados com proteção clínica (KING et al., 2008; NICOLETE et al., 2016). Portanto, a DBPII tem sido apontada como um importante candidato para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária causada pelo *P. vivax*.

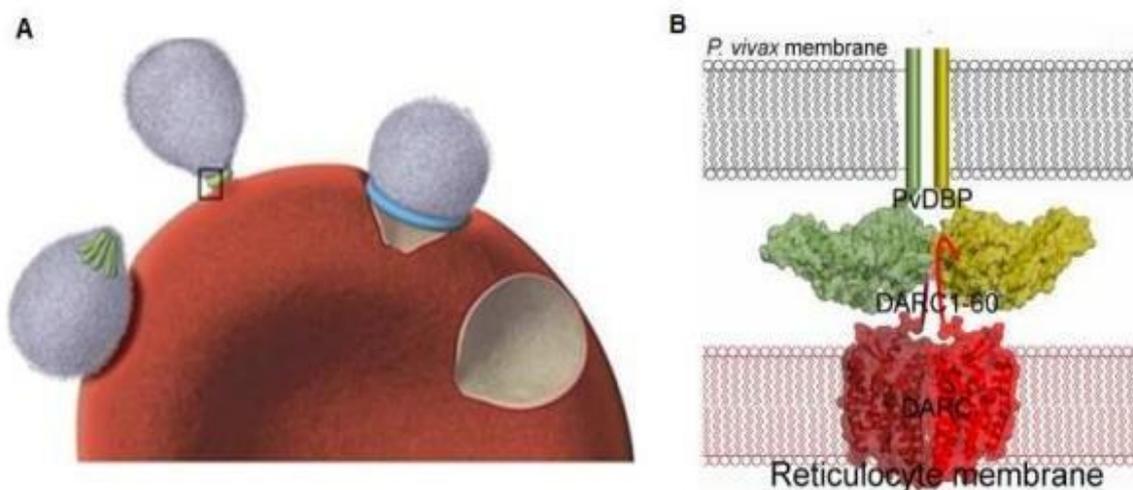
#### 1.4 Duffy Binding Protein (DBP) de *P. vivax*

A DBP é uma proteína de aproximadamente 140kDa localizada nos micronemas do merozoíto de *P. vivax* que se liga ao receptor DARC expresso em eritrócitos (ADAMS et al., 1990). Como descrito acima, essa é a única via conhecida da junção irreversível do processo de invasão utilizada pelo *P. vivax* para infectar os reticulócitos (MILLER et al., 1976; ADAMS et al., 1992). A DBP possui sete regiões (I-VII), sendo que na região II se encontra o domínio de ligação da proteína com o receptor DARC. A região II da DBP (DBPII) é constituída por 330 aminoácidos (aa) que se caracteriza por apresentar um domínio de 12 resíduos de cisteína conservados (CHITNIS e MILLER, 1994).

No momento que a DBP é exposta pelo merozoíto, encontra-se na forma de monômero. No entanto, no momento da ligação da região II da DBP (DBPII) com o receptor DARC, ocorre inicialmente a dimerização da DBP que é essencial para a posterior dimerização do receptor DARC (BATCHELOR et al.,

2012). Dessa forma, o complexo final da interação é composto por duas moléculas da DBP e duas moléculas do receptor DARC (Figura 2B). Uma vez estabelecida a ligação entre a DBP e o receptor DARC, o processo de invasão se torna irreversível e ocorre a penetração do parasito no reticulócito (WERTHEIMER e BARNWELL, 1989).

**Figura 2-** Representação do processo de invasão pelo *Plasmodium sp.* em eritrócitos e interação molecular do processo de invasão pelo *P. vivax*. **(A)** Esquema do processo de invasão do *Plasmodium sp* no eritrócito, envolvendo etapas como adesão, orientação da extremidade apical do merozoíto, formação de junção irreversível e invasão; **(B)** Representação da interação molecular entre o receptor DARC, expresso na membrana do reticulócito e a DBP de *P. vivax*.



**Fonte:** Adaptado de Beeson e Crabb, 2007 e Batchelor *et al.*, 2012.

Estudos sobre a resposta imune humoral contra a DBP realizados em populações de diferentes regiões geográficas mostraram que, embora pouco imunogênica, a DBP é naturalmente imunogênica em indivíduos expostos ao *P. vivax*, com frequência de respondedores que variam de 32% a 67% (BARBERDO *et al.*, 2007; TRAN *et al.*, 2005). O aumento da frequência positiva de anticorpos contra a DBP foi associado com o aumento do tempo de exposição ao parasito, a idade e número de episódios prévios de malária (COLE-TOBIAN *et al.*, 2009; CERAVOLO *et al.*, 2005; KING *et al.*, 2008; CERAVOLO *et al.*, 2009; SOUZA-SILVA *et al.*, 2010; KANO *et al.*, 2012). Além disso, demonstrou-se que a DBP II induz anticorpos capazes de inibir a interação

entre DBPII-DARC (BIAbs) (GRIMBERG *et al.*, 2007; CERAVOLO *et al.*, 2008; KING *et al.*, 2008; CERAVOLO *et al.*, 2009; CHOOTONG *et al.*, 2010; CHOOTONG *et al.*, 2012; SOUZA-SILVA *et al.*, 2014), o que indica que BIAbs possam impedir a invasão dos reticulócitos pelos merozoítos de *P. vivax*. Além disso, a presença de anticorpos com alta capacidade bloqueadora da interação DBPII-DARC foi associada com a proteção clínica contra a doença (KING *et al.*, 2008; NICOLETE *et al.*, 2016).

Apesar dos resultados animadores, alguns indivíduos de áreas com altos níveis de transmissão de *P. vivax* não são capazes gerar uma resposta de anticorpos contra a DBPII (FRASER *et al.*, 1997; MICHON *et al.*, 1998; SOUZA-SILVA *et al.*, 2010). De fato, um estudo realizado na Papua Nova Guiné, região considerada de alta endemicidade para a malária, mostrou que 40% dos indivíduos não apresentaram resposta positiva de anticorpos anti-DBPII (FRASER *et al.*, 1997). Na Amazônia brasileira, a frequência de respondedores também foi baixa, variando de 27% a 50% dos indivíduos que apresentaram anticorpos contra a DBP (KANO *et al.*, 2012; SOUZA-SILVA *et al.*, 2010). Embora a DBP seja pouco imunogênica, felizmente, quando os anticorpos específicos são adquiridos, parecem ser estáveis sob exposição contínua à malária (KING *et al.*, 2008; SOUZA-SILVA *et al.*, 2010).

A baixa imunogenicidade da DBPII pode ser explicada pela influência pelos polimorfismos genéticos do hospedeiro, como no receptor DARC e alelos de HLA de classe II (KANO *et al.*, 2018; MAESTRE *et al.*, 2010; SOUZA-SILVA *et al.*, 2014). Além disso, a baixa imunogenicidade também pode ser explicada pelo fato dessa proteína ser exposta somente no momento da invasão dos reticulócitos (ADAMS *et al.*, 1990) e pelo polimorfismo na região II que circunda o domínio de ligação da DBP (TSUBOI *et al.*, 1994; COLE-TOBIAN e KING, 2003). Esses polimorfismos estão associados com a indução de anticorpos variante-específicos (CERAVOLO *et al.*, 2009; SOUZA-SILVA *et al.*, 2014; MUELLER *et al.*, 2013), o que constitui desafios para o desenvolvimento de uma vacina com base nesta proteína. Estudos demonstraram que a região II é a região mais polimórfica da proteína (HANS *et al.*, 2005; RANJAN e CHITNIS, 1999) conferindo diversidade genética entre os isolados de *P. vivax*

provenientes de diferentes regiões geográficas (GOSI *et al.*, 2008; KHO *et al.*, 2001; SOUSA *et al.*, 2006). Embora os resíduos polimórficos estejam amplamente distribuídos por toda a região II da DBP, os resíduos 417, 419 e 424, que circundam ao domínio de ligação da proteína ao reticulócito, parece desviar a resposta imune constituindo papel no mecanismo de evasão do sistema imune (SOUSA *et al.*, 2010).

Estudos do nosso grupo mostraram que a resposta de anticorpos bloqueadores contra a DBP é variante-específica, e a variabilidade da DBP é alta nos isolados circulantes da área endêmica (CERAVOLO *et al.*, 2009; SOUSA *et al.*, 2011). Outros trabalhos mostraram resultados semelhantes onde a resposta de anticorpos inibitórios contra DBP foi associada a proteção homóloga (COLE-TOBIAN *et al.*, 2009; CHOOTONG *et al.*, 2012). Além disso, a inibição de DBPII-DARC por anticorpos monoclonais (AcMo) mostrou ter especificidade alélica (NTUMNGIA *et al.*, 2012). Nesse sentido, devido à grande variabilidade entre os isolados geográficos de DBPII, sugere-se que pelo menos sete variantes deveriam ser incluídas na vacina contra *P. vivax* para se ter uma cobertura de 60% das sequências de DBP já descritas (SOUSA *et al.*, 2011). Portanto, esses dados demonstram que a geração da resposta imune contra a DBP é complexa e para o desenvolvimento de uma vacina baseada na DBPII de *P. vivax*, deve-se levar em consideração regiões de alta diversidade da proteína e o predomínio dos alelos de DBPII nas diferentes regiões geográficas. Nesse sentido, a adoção de estratégias que direcionam a resposta imune para epítopos conservados auxiliaria na geração de uma resposta de anticorpos com ampla abrangência às variantes da proteína, conseqüentemente no desenvolvimento de uma vacina com ampla abrangência.

### **1.5 Antígenos sintéticos baseados na DBPII – DEKnull e DEKnull2**

Apesar do alto nível de polimorfismo na DBPII, a existência de indivíduos capazes de gerar anticorpos bloqueadores com reatividade a mais de uma variante dessa proteína (CERAVOLO *et al.*, 2008; NICOLETE *et al.*, 2016), sugere que a resposta de anticorpos seja direcionada para as regiões

conservadas. Na tentativa de mapear epítomos relacionados com imunidade protetora da DBPII, Chootong e colaboradores (2010) utilizaram soros de indivíduos com alta capacidade bloqueadora da interação DBPII-DARC, onde identificaram epítomos dominantes de células B altamente polimórficos na DBPII, inferindo que o direcionamento da resposta de anticorpos ocorra preferencialmente aos epítomos polimórficos ao invés de epítomos conservados. Ainda, o uso de um painel de anticorpos monoclonais com capacidade bloqueadora da interação DBPII-DARC mostrou que mais de 90% dos epítomos reconhecidos estão conservados nas sequências de DBPII analisadas (CHEN *et al.*, 2016). Portanto, a identificação desses epítomos podem auxiliar na escolha e no desenvolvimento de uma vacina baseada em DBPII capaz de abranger todas, ou a maior parte das variantes circulantes dessa proteína.

Neste sentido, Ntumngia e Adams (2012) desenvolveram antígenos vacinais sintéticos baseados na DBPII com o objetivo de gerar uma resposta imune contra epítomos conservados da proteína. A construção da primeira geração do antígeno sintético, denominado DEKnull, teve como base a deleção por mutação do epítomo dominante mais polimórfico de células B (**DEKAQRRKQ**) e não relevante para a estrutura 3D da DBPII (NTUMNGIA e ADAMS, 2012). DEKnull se mostrou imunogênico e capaz de gerar anticorpos com a capacidade de bloquear a interação ligante-receptor (BIAbs) em camundongos imunizados. No entanto, os níveis de BIAbs gerados contra DEKnull foram inferiores aos obtidos contra a variante de referência Salvador 1 (Sal1) da DBPII (DBPII-Sal1) (NTUMNGIA e ADAMS, 2012). Dessa forma, a segunda geração do antígeno sintético (DEKnull-2) foi desenvolvido com o objetivo de otimizar a indução da resposta imune. A DEKnull-2 se baseia na alteração dos resíduos polimórficos não conformacionais ao longo da região II da proteína, além do epítomo polimórfico imunodominante de células B (NTUMNGIA *et al.*, 2017). DEKnull-2 mostrou elevada imunogenicidade em modelo murino com geração de anticorpos anti-DEKnull-2 com ampla capacidade bloqueadora da interação da DBPII-DARC *in vitro* para todas as variantes avaliadas. Além disso, indivíduos da Amazônia brasileira expostos à malária, apresentaram alta reatividade à DEKnull-2, os quais, foram capazes de bloquear em cerca de 80% a invasão *in vitro* de *P. vivax* em reticulócitos humanos (NTUMNGIA *et al.*, 2017).

Até o momento, os resultados são bastante promissores, uma vez que DEKnull-2 foi altamente reconhecido em uma população da Amazônia brasileira e a resposta de anticorpos foi estável ao longo de nove anos (NUTMNGIA *et al.*, 2017, PIRES *et al.*, 2018). Além disso, anticorpos IgG direcionados aos epítomos conservados (DEKnull-2) são mais estáveis e associados com a resposta de anticorpos inibitórios (BIAbs) da interação DBPII-DARC (MEDEIROS *et al.*, 2020). Um estudo recente, desenvolvido pelo nosso grupo, mostrou que indivíduos primo-infectados tiveram a resposta de anticorpos IgG anti-DEKnull-2 reforçada após o quadro de recaída da doença (LIMA *et al.*, 2022), o que corrobora o potencial da DEKnull-2 como antígeno vacinal. Dessa forma, conhecer as bases celulares e moleculares envolvidas na geração da resposta de anticorpos com alta capacidade bloqueadora da interação DBPII-DARC e de longa duração é de grande importância para aprimorar este candidato à vacina contra a malária causada pelo *P. vivax*.

## **1.6 Resposta imune à malária**

### **1.6.1 Imunidade inata**

Ao contrário do que foi observado para infecções por outros patógenos intracelulares, incluindo vírus (LEHNER *et al.*, 2007), bactérias (MEDZHITOV, 2007) e alguns protozoários (HONDOWICZ *et al.*, 1999; GOLGHER *et al.*, 2004; LANG *et al.*, 2007), em que o papel da resposta imune inata tem sido amplamente investigado, poucos estudos são direcionados para a resposta imune inata à malária em humanos. As primeiras interações entre estágios sanguíneos do parasito e as células do sistema imune inato do hospedeiro humano são consideradas importantes para moldar a resposta imune adaptativa contra a infecção (ING *et al.*, 2006). Além disso, a resposta imune inata é essencial não somente para limitar a fase inicial de multiplicação do parasito, mas também no controle da infecção até o estabelecimento da imunidade adaptativa (STEVENSON *et al.*, 2004). A indução dos mecanismos que caracterizam a imunidade inata independe do contato prévio do hospedeiro com o patógeno, indicando que sua ativação é mediada por moléculas conservadas entre as diferentes espécies ou cepas do microrganismo (STEVENSON *et al.*, 2004).

Essas moléculas conservadas, denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), interagem com receptores Toll (TLRs) presentes nas células do sistema imune (COBAN et al., 2005). A ativação dos TLRs induz a ativação de genes que leva a uma produção de citocinas pró-inflamatórias, ativação de peptídeos antimicrobicidas e também a um aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias e do complexo de histocompatibilidade (MHC) (AKIRA e TAKEDA 2004; GAZZINELLI et al., 2004; PICHYANGKUL et al., 2004; COBAN et al., 2005).

Certos componentes do *Plasmodium* são capazes de ativar TLRs levando a uma regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias que em altas concentrações podem induzir a patogênese na infecção malárica (NEBL et al., 2005; COBAN et al., 2005; PARROCHE et al., 2007). Três PAMPs foram descritos como potenciais indutores da ativação dos TLRs: as âncoras de GlicosilFosfatidilinositol (GPI), ácidos nucleicos derivados de *Plasmodium* e a hemozoína ligada ao DNA do parasito. Essas moléculas são responsáveis pela ativação do TLR2, TLR4 e TLR9, que parecem ser os principais receptores envolvidos na resposta inata (COBAN et al., 2005; KRISHNEGOWDA et al., 2005; PARROCHE et al., 2007; FRANKLIN et al., 2009).

Dentre os componentes envolvidos na imunidade inata se encontram as células “Natural Killer” (NK), macrófagos e células dendríticas. Na resposta imune inata, as células NK representam uma importante fonte inicial de IFN- $\gamma$  e são responsáveis pela eliminação do parasito devido aos processos de citotoxicidade desencadeados em resposta ao parasito (OJO-AMAIZE et al., 1984; DOOLAN et al., 1999; ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2002). Durante a infecção por *Plasmodium*, além de atuarem como células apresentadoras de antígenos, os macrófagos apresentam um importante papel na imunidade inata devido a sua habilidade de fagocitar eritrócitos infectados na ausência de anticorpos específicos citofílicos e/ou opsonizantes (SERGHIDES et al., 2003).

Um dos componentes da resposta imune ainda pouco explorado na malária humana são as células dendríticas, responsáveis pela iniciação da resposta pró- inflamatória após apresentação de antígenos para as células T do hospedeiro (LANGHORNE et al., 2004). Estudos mostram que, a ativação de

PAMPs além de detectarem a presença de infecção e ativar a imunidade inata, também descendeiam vias de sinalizações que levam à ativação da imunidade adaptativa, esses sinais são responsáveis por orquestrar o início, tipo, magnitude e a duração da resposta, além da indução de memória de longo prazo (BANCHEREAU et al., 2000; PALM e MEDZHITOV 2009). Além disso, tem se tornado evidente que as células dendríticas desempenham um papel crítico na amplificação da resposta imune inata, particularmente estimulando a ativação de células NK (FERLAZZO et al., 2002; GEROSA et al., 2005). Dessa forma, as células da resposta imune inata possuem um papel central na resposta imune adaptativa (STEVENSON et al., 2004).

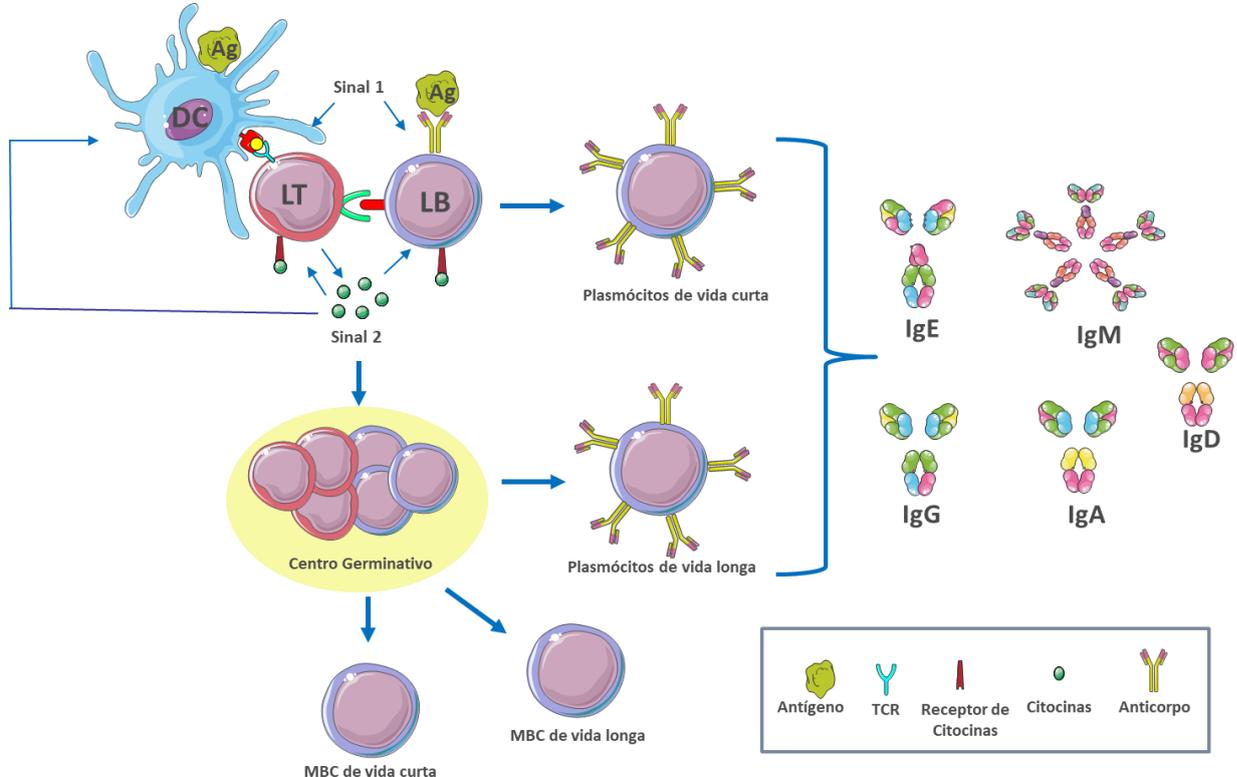
### **1.6.2 Imunidade naturalmente adquirida**

No que se refere à imunidade naturalmente adquirida (INA) na malária, estudos demonstram o desenvolvimento de forma lenta e gradativa após sucessivas infecções (COHEN et al., 1961; MCGREGOR, 1974; BAIRD et al., 1991). Dessa forma, somente após anos de exposição contínua ao parasita é que ocorre o desenvolvimento da imunidade clínica (IC), que protege contra a doença, mas não contra a infecção (DOOLAN et al., 2009). Essa proteção é mediada principalmente pela resposta específica de anticorpos a antígenos de fase sanguínea do parasito (GOOD et al., 2005). De fato, a transferência de soro (Imunoglobulinas) de adultos imunes à malária para crianças com malária aguda reduziu os sintomas e a parasitemia (COHEN et al., 1961), indicando a importância dos anticorpos contra a doença.

Embora exista um consenso da importância dos anticorpos contra as proteínas de fase sanguínea do parasito na INA, que auxiliam na redução da parasitemia e dos sintomas clínicos da doença (COHEN *et al.*, 1969; O'DONNELL *et al.*, 2001; BOYLE *et al.*, 2015; HILL *et al.*, 2013; Chan *et al.*, 2014), a imunidade mediada por células também contribui nesse processo (GOOD et al., 2005; YAP, HUSTIN e SAUERWEIN, 2019). O auxílio das células T CD4 + cognatas é necessária para a ativação, proliferação de células B e maturação de afinidade e troca de classe de imunoglobulinas (BRIGL e BRENNER, 2004) (Figura 3). Linfócitos T auxiliares foliculares (Tfh), que colocalizam com linfócitos B nos

centros germinativos (GCs), são cruciais tanto para a ativação de linfócitos B virgens durante infecções primárias, quanto para reativação de células B de memória (MBC) em infecções secundárias (DÖRNER e RADBRUCH, 2005). Os linfócitos Tfh e outros linfócitos T CD4+ podem ativar os linfócitos B virgens a se diferenciarem em linfócitos B de memória (MBCs) e/ou plasmócitos (PC), altamente produtor de anticorpos, onde MBCs podem ser reativadas rapidamente para produzirem anticorpos específicos durante infecções secundárias (DÖRNER e RADBRUCH, 2005; YAP, HUSTIN e SAUERWEIN, 2019). A geração de centros germinativos (CG) eficazes é fundamental para geração da imunidade humoral de alta afinidade a patógenos (SURETTE e BUTLER, 2022).

**Figura 3-** Representação esquemática da ativação de linfócitos B por duas sinalizações e geração de células B de memória de curta e longa duração e células secretoras de anticorpos. O primeiro sinal de ativação é dado pelo próprio antígeno, que no caso do LB se liga diretamente à imunoglobulina de membrana; já no caso do LT, o antígeno é apresentado por outra célula via moléculas de MHC ao TCR. O segundo sinal pode ser dado por interações de moléculas co-estimulatórias (interação CD28 e B7.1/B7.2 ou CD40 – CD40L), ou, ainda, estímulo por citocinas oriundas das células apresentadoras de antígeno ou por produtos gerados pelo microorganismo infectante.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

No entanto, o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e persistência de células B de memória (MBCs) após a infecção

por *Plasmodium* spp ainda são limitados. Alguns estudos têm mostrado que embora os títulos de anticorpos tendem a cair na ausência prolongada de exposição ao parasito, as MBCs específicas contra antígenos do *P. falciparum* foram capazes de persistir por anos (MIGOT et al., 1995; WIPASA et al., 2010; NDUNGU et al., 2012; NDUNGU et al., 2013), fato de grande relevância no desenvolvimento de vacinas. Além disso, os poucos estudos realizados até o momento sobre especificidade e longevidade da resposta de células B contra antígenos de *P. vivax* (PvRALP1-Ecto, PvRhopH2, PvMSP8, PvAMA-1 e PvMSP-9) não encontraram correlação positiva entre os níveis de anticorpos e a frequência de MBCs antígeno-específicas no período estudado (KOCHAYOO et al., 2019a; KOCHAYOO et al., 2019b; SOARES et al., 2019; SOARES et al., 2020).

Esses achados indicam que o desenvolvimento da imunidade duradoura contra a malária parece ser deficiente, uma vez que, os indivíduos expostos tendem a desenvolver uma resposta de anticorpos de vida curta. Assim, a exposição contínua aos antígenos do parasito parece ser necessária não só para a geração de células de memória, mas também para a manutenção e persistência de anticorpos (NJAU e JACOB, 2012). Além disso, ainda pouco se sabe sobre a aquisição e manutenção das células envolvidas na geração de anticorpos protetores na malária causada pelo *P. vivax*. Portanto, estudos direcionados a esse parasito, com aprofundamento no conhecimento dos mecanismos que induzem uma imunidade clínica protetora, especialmente relacionado com a indução e manutenção das células B de memória duradora, é de fundamental importância e são necessários para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o *P. vivax*.

### **1.6.3 Resposta transcricional do hospedeiro na imunidade à malária**

Diversos fatores podem contribuir na falha do estabelecimento da imunidade protetora e de longa duração na malária, como a extensa diversidade genética do parasito (TAKALA; PLOWE, 2009), a ampla variação clonal das proteínas expressas durante o ciclo de replicação do *Plasmodium* spp. (SCHERF et al., 2008), a intensidade de transmissão da doença (ESCALANTE et al., 1998;

DORFMAN et al., 2005; WEISS et al., 2010; WIPASA et al., 2010) e fatores relacionados aos mecanismos fisiológicos e genéticos do hospedeiro que atuam na imunidade inata e no desenvolvimento da imunidade adquirida contra o parasito (STEVENSON e RILEY, 2004; LANGHORNE et al., 2008).

Durante a infecção, alguns hospedeiros parecem responder intensamente com um extenso número de genes ativados e vias biológicas, enquanto em outros hospedeiros podem permanecer relativamente inalteradas (ADAMS *et al.*, 2009; IDAGHDOUR *et al.*, 2012). Nesse sentido, no caso de infecção por malária diversas vias e/ou genes desempenham papéis fundamentais no sistema de defesa do hospedeiro humano, podendo levar ao desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra a doença e reduzir a suscetibilidade do hospedeiro aos efeitos patogênicos desencadeados pelo parasito (STEVENSON e RILEY, 2004; LANGHORNE et al., 2008; YAMAGISHI *et al.*, 2014).

Particularmente, os genes da resposta imune inata são bem caracterizados como sensores de defesa de primeira linha. Os receptores Toll-like (TLRs) e vários outros receptores de reconhecimento de padrões reconhecem patógenos e componentes relacionados e desencadeiam cascatas de sinalização a jusante (KAWAI e AKIRA 2010; TAKEUCHI e AKIRA 2010). Especialmente em uma infecção por malária, o TLR9 é responsável por reconhecer de forma específica a hemozoína (COBAN et al. 2005, 2010; PARROCHE et al. 2007), um produto da degradação do grupamento heme (PHAM et al., 2020). Após o reconhecimento, a via TLR a jusante é ativada, eventualmente levando à ativação de dois grupos principais de fatores de transcrição: o grupo NF- $\kappa$ B (como o complexo NF $\kappa$ B1:RELA) e AP-1 (como o complexo FOS:JUN) e os IRFs. Por meio desses fatores de transcrição, uma série de citocinas pró- inflamatórias, como TNF, IL1 e IL6, são subsequentemente induzidas (PAHL 1999; DINARELLO 2000; GILMORE 2006; HOFFMANN et al., 2006; KISHIMOTO 2006). Particularmente, o grupo de fatores de transcrição IRF induz respostas de interferon tipo I (IFN) (SATO et al., 2009). Eles modulam ainda mais as respostas inflamatórias e induzem respostas imunes adquiridas (ITO et al., 2002; PALM e MEDZHITOV 2009).

Em relação à imunidade adquirida, foi visto que células B atípicas T-bet<sup>+</sup> (atBCs) específicas para antígenos de *P. falciparum* mostraram ativação de vias envolvidas na diferenciação em células secretoras de anticorpos e regulação positiva de moléculas que medeiam interações de células B-T, sugerindo que atBCs respondem às células T auxiliares foliculares (Tfh) (HOPP et al., 2022). Além disso, as células B do centro germinativo (GC) parecem regular positivamente o fator de transcrição T-bet durante a infecção malárica por *P. falciparum* em modelo murino, influenciando na mutação de afinidade de Ig aumentada e maturação de afinidade de anticorpo melhorada (LY et al., 2019). As implicações desses processos são de interesse para o desenvolvimento de vacinas contra infecções, onde as células B de memória T-bet<sup>+</sup> e as células plasmáticas desempenham um papel fundamental no controle da infecção (BARNETT et al., 2016; KNOX et al., 2017; RUBTSOVA et al., 2013), e as taxas de mutação aumentadas podem favorecer o desenvolvimento de anticorpos protetores e amplamente neutralizantes (KWONG et al., 2013). Ainda nesse sentido, um estudo demonstrou que as reações de células B do GC, respostas de anticorpos com troca de isotipo, controle de parasitos e sobrevivência do hospedeiro requerem sinalização de IL-10 intrínseca às células B (GUTHMILLER et al., 20017). Em relação aos mecanismos pelos quais a IL-10 reforça a imunidade humoral, dados recentes mostram que a IL-10 promove a ativação de células B e a expressão de MHC de classe II e moléculas de adesão, além de limitar a imunopatologia induzida por IFN- $\gamma$  (SURETTE et al., 2021).

Por outro lado, alguns genes parecem influenciar de forma negativa a resposta frente à infecção, podendo induzir a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias (RIVERA-CORREA et al., 2017; GUTHMILLER et al., 2017). Um estudo mostrou que os TLR2 e TICAM2 se correlacionaram com a gravidade da infecção por malária causada pelo *P. falciparum* (YAMAGISHI et al., 2014). Além disso, alterações patológicas específicas do cérebro foram associadas à infiltração dependente de MyD88 de células T CD8<sup>+</sup>, CCR5<sup>+</sup> e células dendríticas CD11c<sup>+</sup>, incluindo células CD11c<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup> e B220<sup>+</sup>, e regulação positiva de genes como Granzyme B, Lipocalin 2, Ccl3 e Ccr5, sugerindo que a patogênese da malária cerebral (MC) dependente de MyD88 mediada por TLR2 e/ou TLR9 pode desempenhar um papel crítico na MC levando a complicações

durante a infecção por *P. berghei* ANKA (PbA) (COBAN et al., 2007).

Dessa forma, os níveis de expressão de genes do hospedeiro induzidos pela infecção ao *Plasmodium*, possuem um papel fundamental para determinar a gravidade da doença (ADAMS et al., 2009; LEE et al., 2018). No entanto, apesar do rápido progresso quanto à análise das respostas imunes do hospedeiro frente à infecção, o conhecimento atual é principalmente limitado ao obtido a partir de modelos murinos ou sistemas de infecção de laboratório. Pouco se sabe sobre os padrões de expressão gênica *in situ* em humanos. De fato, as características clínicas, incluindo a gravidade dos sintomas da malária, são altamente variáveis. E ainda, existem poucos estudos até o momento voltados para a identificação de genes do hospedeiro envolvidos na resposta à infecção por *P. vivax*. Por isso, investigar um grande conjunto de genes envolvidos na ativação de células da imunidade adquirida, pode nos auxiliar a identificar marcadores e vias ligadas ao estabelecimento de resposta imune estável e persistente contra o *P. vivax*.

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos esforços para o controle da malária nas áreas endêmicas, essa doença ainda representa um grande problema de saúde no mundo. O desafio de reduzir o impacto da malária nas populações acometidas, torna-se ainda maior quando se leva em consideração a resistência dos parasitos aos fármacos disponíveis, bem como o aumento de morbidade e mortalidade devido ao potencial de recidivas do *P. vivax* (PRICE *et al.*, 2007; ALEXANDRE *et al.*, 2010). Portanto, estes fatores constituem motivos de preocupação, o que reforça a necessidade de se desenvolver uma vacina para contribuir no controle dessa doença.

Neste sentido, os estudos que visam proteínas do estágio sanguíneo de *P. vivax* reforçam que é viável o desenvolvimento de uma vacina capaz de bloquear e impedir o desenvolvimento do parasito (PATARROYO *et al.*, 2012). De fato, nosso grupo e outros mostramos que indivíduos anticorpos contra a principal proteína de invasão da DBPII é capaz de bloquear a interação receptor-ligante e estão associados com a proteção clínica (GRIMBERG *et al.*, 2007; CERAVOLO *et al.*, 2008; KING *et al.*, 2008; SOUZA-SILVA *et al.*, 2014). Contudo, um dos grandes desafios para o desenvolvimento de uma vacina baseada nesta proteína é o polimorfismo na região do ligante da DBPII e a indução de anticorpos variante-específica (CERAVOLO *et al.*, 2009; COLETOBIAN *et al.*, 2009; CHOOTONG *et al.*, 2012), o que limitaria o uso desta vacina globalmente. Felizmente, juntamente com a colaboração do Dr. John Adams da Universidade do Sul da Florida (USF), o antígeno sintético DEKnull-2 desenvolvido com base na DBPII que visa indução da resposta imune contra epitopos conservados tem se mostrado promissor, capaz de induzir anticorpos neutralizantes com ampla reatividade às variantes de DBPII (NTUMNGIA *et al.*, 2014; NTUMNGIA *et al.*, 2017), além de apresentar alta reatividade em indivíduos sob longa exposição à malária (NTUMNGIA *et al.*, 2017; MEDEIROS *et al.*, 2020).

Além disso, nosso grupo de pesquisa vem conduzindo desde 2008, um estudo longitudinal de base populacional de longa duração em uma população do interior do Estado do Amazonas, onde identificamos indivíduos com resposta

persistente de anticorpos aos antígenos de *P. vivax*, com alta neutralização às variantes de DBPII, denominados de respondedores de elite (RE) (KANO et al., 2016; SOUZA-SILVA et al., 2014). Portanto, nossa hipótese é que os RE desenvolvem uma resposta de células B de memória eficiente e de longa duração específicas para DBPII. Portanto, os respondedores de elite apresentam características únicas que nos permitirá identificar genes e/ou vias do sistema imune do hospedeiro que são ativados sob estímulo específicos. Esperamos que com isso, possamos contribuir na compreensão dos mecanismos moleculares que desempenham papéis fundamentais no estabelecimento de uma resposta imune protetora contra o parasito da malária e também validar a DEKnull-2 como antígeno para o desenvolvimento de uma vacina contra *P. vivax*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o perfil de expressão gênica de ativação de células T e B associado com a resposta imune de longa duração em indivíduos da Amazônia brasileira contra os antígenos DBPII e DEKnull-2.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a frequência e dinâmica da resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes (DBPII e antígeno sintético DEKnull-2);
- Caracterizar o perfil de respondedores de longa duração à DBPII e DEKnull-2;
- Avaliar o perfil da expressão de genes envolvidos na ativação de células T e B específicas em respondedores de elite e não respondedores para DEKnull-2 e DBPII-Sal1;
- Identificar marcadores e/ou vias específicas relacionadas com a resposta imune duradoura nos respondedores de elite.

## 4. MATERIAIS E METODOS

### 4.1 Área e população de estudo

O estudo foi desenvolvido no assentamento agrícola de Rio Pardo, localizado no município de Presidente Figueiredo, estado do Amazonas, à aproximadamente 139 km de Manaus, com acesso pela rodovia BR-174 que liga o estado do Amazonas ao estado de Roraima (Figura 4). O assentamento agrícola foi oficialmente criado em 1996 pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), como parte dos grandes projetos de colonização da Amazônia focados na agricultura e ocupação humana da região (DE CASTRO *et al.*, 2006). Segundo o último Censo populacional de Rio Pardo realizado em 2019 pelo nosso grupo de pesquisa, a população é composta por cerca de 158 famílias, com uma média de quatro moradores por casa, que residem em áreas de igarapé (residências ao longo e em torno das ramificações do rio Rio Pardo) e área de ramal (residências em torno de estradas não pavimentadas). A população do estudo vive principalmente da agricultura de subsistência e da pesca (KANO *et al.*, 2012).

O serviço de saúde local é restrito e inclui um posto de diagnóstico de malária da Secretaria de Vigilância em Saúde que oferece o diagnóstico microscópico e tratamento gratuito para a população da área. Há duas estações bem definidas típica da região Amazônica: um período chuvoso (novembro a maio) e um período de seca (junho a outubro). A temperatura média anual da região é de 31°C, com clima úmido e precipitação média anual de 2.000 mm por ano (FISH *et al.*, 1998).

Os aspectos éticos e metodológicos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (CEP/ IRR) e CONEP sob o CAAE: 96098618.9.0000.5091.

**Figura 4-** Mapa do Brasil na América do Sul mostrando a localização da região endêmica para malária na Amazônia brasileira (verde) e em destaque a localização do assentamento agrícola de Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo, AM.



Fonte: adaptado de *U.S. Geological Survey (USGS)*.

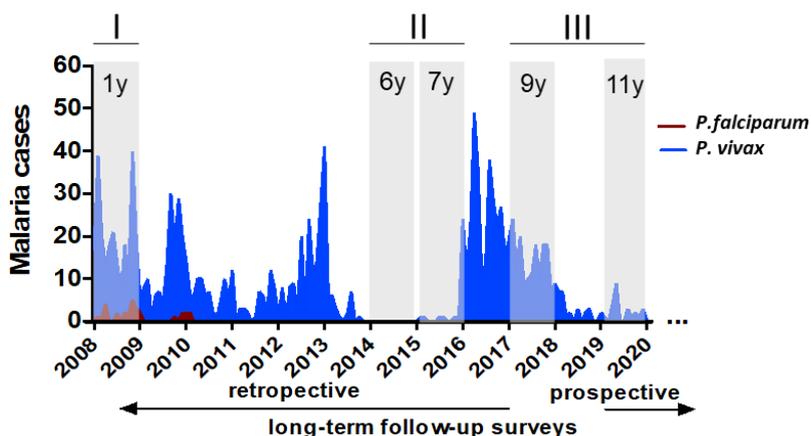
#### 4.1.1 Desenho experimental do estudo longitudinal

Nosso grupo vem conduzindo um estudo longitudinal na população de Rio Pardo desde novembro de 2008 sob os aspectos de resposta imune contra os antígenos candidatos à vacina de *P. vivax*. O estudo longitudinal envolve uma parte retrospectiva e prospectiva. O estudo retrospectivo envolverá as amostras congeladas que foram coletadas em períodos de transmissão de malária variável (Figura 5). Os inquéritos transversais foram realizados em período de alta/ média (período I e III) transmissão como no 1º ano (2008/2009) e 9º ano (2018), enquanto que nos anos 6º e 7º foram realizados em período de baixa transmissão (período II), como mostra a Figura 5. O período retrospectivo do estudo permitiu identificar indivíduos com resposta persistente de anticorpos e com alta capacidade neutralizante contra interação DBPII-DARC (BIAbs) de *P. vivax*, inclusive no período de baixa transmissão, denominados de

respondedores de elite (RE). Além disso, os indivíduos que não apresentam resposta de anticorpos contra os antígenos de *P. vivax* em todo o período do estudo, foram classificados de não respondedores (NR) (KANO *et al.*, 2016; SOUZA- SILVA *et al.*, 2014).

As amostras utilizadas no presente trabalho, foram obtidas no início do estudo prospectivo, coletadas no 11<sup>o</sup> ano de acompanhamento realizado em agosto de 2019 (Figura 5).

**Figura 5-** Distribuição temporal do número de casos de malária por espécie de *Plasmodium* spp e os respectivos anos de acompanhamento do estudo longitudinal realizados (1<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 9<sup>o</sup> e 11<sup>o</sup> ano) na população de estudo - Rio Pardo, representados pela barra em cinza. Os casos de malária no período de 2008 a 2019 foram obtidos pelo Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica – Malária (SIVEP) diagnosticada por microscopia óptica com as espécies causadoras *P. falciparum* (vermelho) e *P. vivax* (azul).



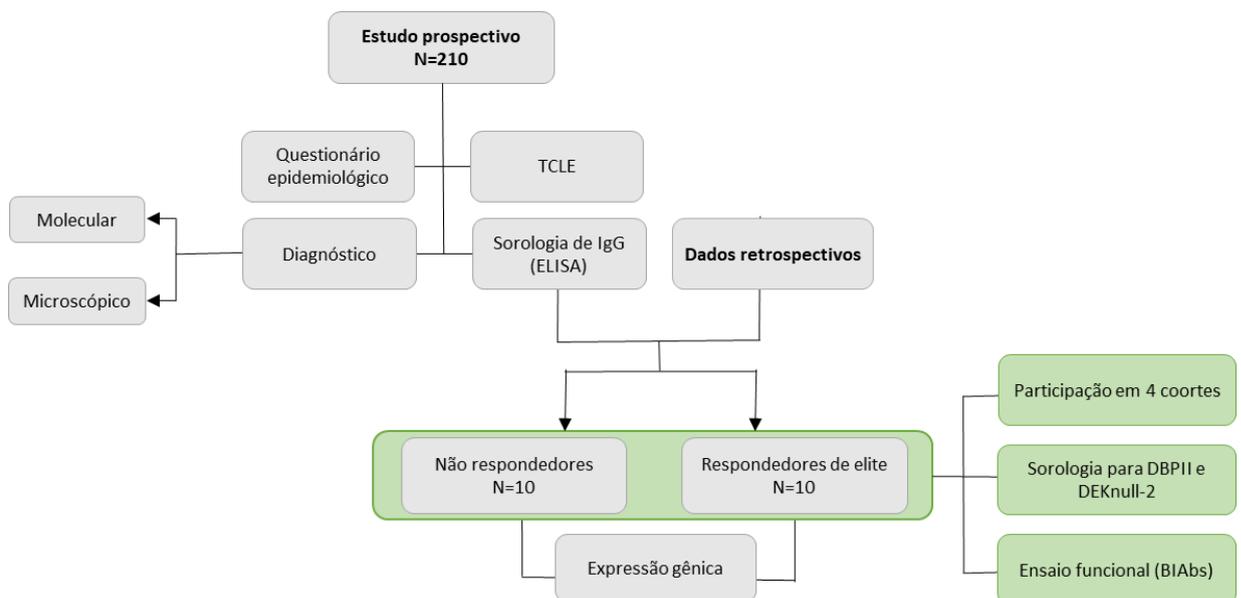
Fonte: adaptado de Kano *et al.*, 2016.

Após a realização do censo populacional, todas as residências foram visitadas. Ao todo, 210 indivíduos participaram do estudo, onde foi obtido o consentimento por escrito por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexo 1). Em seguida, os participantes foram entrevistados, onde dados demográficos, epidemiológicos e clínicos foram obtidos por meio de um questionário bem estruturado (Anexo 2) (Figura 6). A pesquisa foi conduzida conforme as normas vigentes para pesquisa ética envolvendo seres humanos (Resolução N<sup>o</sup> 466, de 12 de dezembro de 2012). Além disso, todos os participantes tiveram o diagnóstico microscópico e molecular por Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) espécie-específica (AMARAL *et al.*, 2019) realizados. No caso de resultado positivo para malária, os pacientes receberam

tratamento, seguindo o protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde.

Para o estudo de expressão gênica, a seleção dos indivíduos para a avaliação do perfil de expressão gênica de ativação de células T e B teve como base a resposta de anticorpos obtida, em conjunto com os resultados do estudo retrospectivo cadastrados no Banco de dados da população de estudo. Os critérios adotados foram: (i) ter participado de pelo menos quatro cortes transversais; (ii) apresentar resultados de sorologia convencional para detecção de anticorpos IgG total contra a DBPII-Sal1 e DEKnull-2 e de (iii) ensaio funcional para detecção de anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC (BIAbs) (estudo retrospectivo). Foram selecionados 20 indivíduos, sendo 10 respondedores de elite (RE), ou seja, indivíduos com resposta positiva para anticorpos IgG total e BIAbs contra pelo menos um dos dois antígenos e, 10 não respondedores persistente - indivíduos com dados de sorologia e de resposta de BIAbs consecutivos negativos. Seguindo esses critérios, 20 indivíduos foram selecionados para a avaliação do perfil de expressão gênica de ativação de células T e B, sendo 10 respondedores de elite (RE) e 10 não respondedores (NR).

**Figura 6-** Delineamento experimental do estudo prospectivo na comunidade de Rio Pardo, estado do Amazonas. Em verde estão destacados os critérios de inclusão utilizados para a seleção dos indivíduos para avaliar o perfil de expressão gênica de ativação de células T e B sob estímulo de DBPII e DEKnull-2.



**Fonte:** elaborado pelo autor.

## 4.2 Coleta de amostras e Processamento

Cerca de 40 mL de sangue total foram coletados em tubo de vacutainer contendo heparina sódica para obtenção de plasma, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e DNA para os ensaios de detecção de anticorpos, expressão gênica e o diagnóstico molecular de malária de cada voluntário, respectivamente.

### 4.2.1 Obtenção de plasma e isolamento de células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cell – PBMC*)

Uma alíquota de sangue total foi destinada para extração de DNA (1mL) para diagnóstico molecular de malária e outro 1mL foi centrifugado em 400 x g por 10 minutos para a obtenção do plasma com o objetivo de realizar a sorologia. DNA extraído e plasma foram armazenados a -20°C até a realização dos ensaios.

Para o isolamento de PBMCs, o restante do sangue foi diluído na proporção 1:1 em meio RPMI 1640 incompleto (24 mM bicarbonato de sódio, 25 mM HEPES, 100 U/mL penicilina e 0,017 mM estreptomicina, pH 7,4). Lentamente, o sangue foi adicionado sobre uma solução de histopaque 1077 (Sigma-Aldrich), na proporção de 2:1, e centrifugado a 400 x g por 40 min em temperatura ambiente. O anel formado entre a interface do plasma e o histopaque (PBMCs) foi coletado. Após duas lavagens em RPMI incompleto (400 x g por 10 min a 4°C), as células foram ressuspensas em soro fetal bovino (SFB, Gibco), contadas em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada em  $1 \times 10^7$  células/mL ou  $5 \times 10^6$  células/mL em 90% de soro bovino fetal acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). A suspensão de PBMCs foi mantida em câmara de congelamento (Nalgene) contendo isopropanol a -80°C por 24h e posteriormente armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C) até o uso.

## 4.3 Antígenos de *P. vivax* recombinantes

As proteínas recombinantes, DBPII-Sal1 (243aa-573aa), cepa de

referência (FANG et al., 1991) e, DEKnull-2, seu protótipo candidato à antígeno vacinal, foram expressas em *E. coli* com fusão da proteína de 39 kDa com a cauda de 6x-histidina, conforme descrito anteriormente (NTUMNGIA et al., 2012; NTUMNGIA et al., 2017).

#### **4.4 Detecção de anticorpos IgG total específicos pela sorologia convencional**

A detecção de IgG total contra as DBPII Sal-1 e DEKnull-2 recombinantes de *P. vivax* foi realizada pelo ELISA indireto (SOUZA-SILVA et al., 2014). Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 3 µg/mL para ambas as proteínas e mantidas em 4°C por 12 horas, seguida de bloqueio com tampão específico (0,01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15M NaCl pH7,2 + 0,05% Tween 20 (PBS-T) + 5% leite em pó desnatado) por, pelo menos, uma hora. As amostras de plasmas foram diluídas em 1:100 em tampão de diluição (PBS-T 0,05% acrescido de 3% leite em pó desnatado) e incubadas por 1 hora. Após dez lavagens das placas (PBS-T 0,05%), o conjugado anti-IgG humana ligada à peroxidase foi diluído a 1:5.000 em tampão de diluição, adicionado à placa e incubado por 1 hora. A revelação foi feita com 20mg do substrato dihidrocloridrato de ortofenilenodiamina (OPD) diluído em 40 mL de 0,1M tampão citrato pH 5, acrescido de 40µL de peróxido de hidrogênio a 30%.

A leitura da densidade ótica (DO) foi realizada em leitor de ELISA em filtro de comprimento de onda de 492nm (SpectraMax). Os resultados em DO<sub>492nm</sub> de cada amostra foram corrigidos pelo dia do experimento e calculado como:  $DO_{492nm} \text{ corrigido} = \text{Média } DO_{492nm} \text{ Controle Positivo} \times DO_{492nm} \text{ Amostra} / DO_{492nm} \text{ Controle Positivo do dia}$ . O limite de positividade (*cut-off*) para cada proteína foi estabelecido pela média da DO<sub>492nm</sub> de 30 indivíduos nunca expostos malária acrescido de três desvios padrões. Os resultados para cada amostra foram expressos em índice de reatividade (IR) obtido pela divisão entre a média da DO<sub>492nm</sub> da amostra e DO<sub>492nm</sub> do *cut-off*. Amostras com valores de IR > 1 foram consideradas positivas.

#### **4.5 Detecção de anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC (BIAbs) pelo ensaio funcional de COS-7**

Os resultados apresentados da resposta de BIAbs no presente trabalho foram realizados anteriormente e cadastrados no Banco de Dados (BD) da população de estudo e analisados em conjunto com os resultados obtidos nesta dissertação. Resumidamente, células da linhagem COS-7 de rim de macaco verde (*American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA*) foram transfectadas com o plasmídeo pEGFP-DBPII, que codifica a sequência da região II da DBP variante mais predominante da área amazônica (SOUSA et al., 2010) e expressa juntamente com a proteína verde fluorescente (GFP) como gene repórter. Após 48h da transfecção, as células COS-7 transfectadas foram incubadas com plasma na diluição 1:40 durante 1 hora em 37°C acrescido de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, uma suspensão de 10% eritrócitos humanos O+ DARC+ (FY\*A/FY\*B) foi adicionada a cada poço (200 µL/poço), e incubadas por 2h em temperatura ambiente. Após a incubação, os eritrócitos não ligados foram removidos por três lavagens com solução fosfato salina (PBS) tamponada. Como controle positivo da ligação, plasma controle negativo foi utilizado considerando 100% de ligação. A formação de roseta foi quantificada pela contagem de rosetas observadas em 10-20 campos de visão (200x). Rosetas positivas foram definidas como eritrócitos aderentes cobrindo mais de 50% da superfície da célula COS. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula  $100 \times (R_c - R_t)/R_c$ , onde  $R_c$  é a média do número de rosetas presente no controle e  $R_t$  a média do número de rosetas presentes nos soros-testes.

#### **4.6 Cultura de PBMCs estimuladas com antígenos de *P. vivax***

Inicialmente, 1 mL de células a  $1 \times 10^7$  células/mL foram descongeladas parcialmente em banho-maria a 37°C, adicionadas em 10mL de RPMI 1640 completo (10% Soro Bovino Fetal + 1% antibiótico) pré-aquecido (37°C) acrescido de Benzonase nuclease (Thermo Fisher) 20 µg/mL. Em seguida, foram centrifugadas em 1.600 rpm durante 10min em temperatura ambiente. O

sobrenadante foi desprezado e o precipitado celular foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI 1640 completo. A contagem celular foi realizada com uma alíquota de 10 µL da suspensão celular em 90 µL de azul de Tripán (1:10) em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram mantidas em 37 °C acrescida de 5% CO<sub>2</sub> por 6 horas para descanso (“*resting*”). Em seguida, 1x10<sup>6</sup> células/mL foram estimuladas com os seguintes tratamentos: (1) controle negativo – somente meio RPM1640; (2) controle positivo – meio RPMI 1640 completo acrescido de 1x coquetel de estimulação celular (Ionomicina – 670 µM e PMA - 40,5 µM) (*Cell Stimulation Cocktail*, eBioscience™); (3) DBP11 Sal-1 (10 µg/mL) em meio RPMI 1640 completo; (4) DEKnull-2 (10 µg/mL) em meio RPMI 1640 completo. As células foram estimuladas por 12h, mantidas em estufa em 37°C contendo 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram submetidas ao processo de extração do RNA.

#### **4.7 Avaliação do perfil de expressão gênica**

Inicialmente, todas as etapas que envolvem o ensaio de expressão gênica como extração de RNA, pré-amplificação e amplificação foram padronizadas. Em seguida, PBMCs congeladas dos indivíduos selecionados foram submetidas à cultura estimulada com DBP11 e DEKnull-2 e os ensaios de expressão gênica de ativação de células B e T foram realizados, como mostrado a seguir.

##### **4.7.1 Padronização da Extração de RNA**

A partir de 1 x 10<sup>6</sup> PBMC/mL, quatro protocolos de extração de RNA foram avaliados para escolha do protocolo com melhor rendimento e qualidade do RNA extraído.

**Protocolo 1 (P1)** foi utilizado o kit RNAeasy Plus Mini (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. Após o período de estimulação, a cultura de PBMC foi centrifugada por 1 min a 14.000 x g, em seguida, o precipitado celular foi ressuspenso em 600 µL de tampão *RLT lysis* contendo 1% β-mercaptoethanol. Em seguida, o lisado foi transferido para a coluna de eliminação do DNA genômico (gDNA) e centrifugado por 30 segundos a 8.000

x g. Ao sobrenadante, foi adicionado 600  $\mu$ L de etanol 70% e transferido para a coluna de ligação do RNA (*RNeasy spin*), centrifugado por 15 segundos a 8.000 x g. O sobrenadante foi descartado e adicionado o tampão de lavagem (*buffer RW1*) e submetido à centrifugação de 15 segundos a 8.000 x g. Mais duas lavagens foram realizadas com o segundo tampão de lavagem (*buffer RPE*). Ao final, o RNA foi eluído com 45  $\mu$ L de água para biologia molecular livre de RNase.

**Protocolo 2 (P2)**, utilizou-se o protocolo do kit RNAesy Plus Mini (P1) modificado onde se excluiu a coluna de eliminação do gDNA e procedeu-se o protocolo conforme descrito em P1. Ao final, o RNA eluído foi submetido ao tratamento para remoção do gDNA com o kit TURBO DNase (Thermofisher), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, para cada amostra (45  $\mu$ L de RNA total), adicionou-se 5  $\mu$ L de 10x tampão da TURBO DNase, 1,5  $\mu$ L da enzima TURBO DNase e água livre de RNase para o volume final de 65  $\mu$ L. A reação foi incubada em 37°C por 30 minutos, seguida de adição de 20% de solução de parada ao volume final, mantendo-se por cinco minutos para inativação da enzima DNase. Ao final, as amostras foram centrifugadas em 10.000 x g por 15 segundos e o sobrenadante contendo o RNA extraído foi coletado.

**Protocolo 3 (P3)** foi feito com Trizol (Thermofisher) de acordo com recomendação do fabricante. Ao precipitado celular adicionou-se 3mL de TRIzol™ (Thermofisher), seguida de incubação por 5 minutos para a completa dissociação do complexo de nucleoproteínas, seguida de adição de 600  $\mu$ L de clorofórmio, e incubação por 3 minutos. Após centrifugação a 12.000 x g durante 15 minutos, coletou-se a fase superior contendo o RNA. Adicionou-se 1,5 mL de isopropanol mantendo-se em 4°C por 10 minutos para precipitação de RNA. Em seguida, o RNA foi ressuspendido com 3 mL de etanol 75% e submetido à centrifugação por 5 minutos a 7.500 x g a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspendido em 50  $\mu$ L de água livre de RNase.

**Protocolo 4 (P4)** utilizou o protocolo de Trizol P3 associado com adição da coluna de ligação de RNA total do kit RNAesy Plus Mini, conforme o

protocolo P1. Após a obtenção do RNA pelo método P3, o RNA ressuspenso foi adicionado na coluna para ligação do RNA, conforme descrito em P1.

Todas as amostras de RNA extraídas foram concentradas em SpeedVac na metade do volume. Uma alíquota de 2 µL de cada amostra de RNA extraída foi utilizada imediatamente para quantificação e avaliação da integridade do RNA. O restante das amostras foi armazenado em freezer -80°C para posterior processamento para obtenção de DNA complementar (cDNA).

#### **4.7.2 Quantificação e análise da qualidade do RNA extraído.**

A quantificação do RNA extraído foi realizada utilizando o kit Qubit® RNA HS Assay (ThermoFisher). Para cada amostra a ser quantificada foi adicionado 2 µL de RNA em 198 µL de Mix de reação em temperatura ambiente, contendo 1 µL de Qubit® RNA HS Reagent (Component A) e 199 µL Qubit® RNA HS Buffer (Component B). As amostras foram homogeneizadas por 3 segundos e dosadas no equipamento após calibração com o padrão.

Em seguida, a análise da qualidade do RNA extraído foi avaliada quanto ao número de integridade de RNA (RIN), utilizando-se o kit da Agilent RNA 6000 Pico Assay com o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) com limite de detecção de 0,2 ng/µL de RNA. Resumidamente, foi adicionado 1 µL de corante na alíquota de Gel, após homogeneização por 30 segundos. Posterior à centrifugação por 10 minutos a 13.000 x g em temperatura ambiente, 9 µL do gel preparado foi adicionado ao chip, e 1 µL de amostra adicionado aos poços. Após adição das amostras, o chip foi homogeneizado no agitador vortex por 2 minutos a 2.400 rpm. Após leitura no aparelho, a eletroforese capilar de alta tensão foi obtida juntamente com os valores de RIN de cada amostra. O valor de RIN, estima a integridade por meio da análise das intensidades relativas e qualidade das bandas 18S e 28S do RNA ribossomal. Apenas amostras que tinham uma boa integridade (RIN>6) foram utilizadas nos experimentos.

#### **4.7.3 Transcrição reversa para obtenção de cDNA e pré-amplificação**

A partir do RNA extraído, obteve-se a molécula de cDNA de cada amostra

pela reação da transcrição reversa (RT) (Thermofisher), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Inicialmente, foi realizada a preparação da mistura da reação (*Master Mix*) de RT 2x concentrado (*Master mix 2x [ ]*) para cada reação contendo: 2  $\mu\text{L}$  de 10x tampão da RT, 0,8  $\mu\text{L}$  de 25x mistura de dNTP (100 mM), 2 $\mu\text{L}$  de 10x Random Primers da RT, 1  $\mu\text{L}$  de transcriptase reversa *Multiscribe* e 4,2  $\mu\text{L}$  de água livre de nuclease. Em seguida, para cada reação de RT foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  do RNA extraído e 10  $\mu\text{L}$  do RT Master Mix 2x concentrado. A concentração final do RNA foi de 20 ng para reação da RT de 20  $\mu\text{L}$  de volume final. A reação de amplificação da RT foi de 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85 °C realizado no termociclador *Veriti 96-well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)*.

Devido à variação na concentração e número de integridade de RNA das amostras, associado com a limitação da quantidade de PBMCs congeladas obtidas dos respondedores de elite (RE) e não respondedores persistentes (NRP) para o uso nos ensaios de expressão gênica, avaliamos a necessidade de adicionar a etapa de pré-amplificação de cDNA antes do uso nos ensaios de expressão gênica pelo *Taqman Open Array*. Para isso, os dois genes controles Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e Interleucina 2 (IL-2) de alta e baixa expressão, respectivamente, foram selecionados para avaliar a amplificação sem e com a etapa de pré-amplificação pela qPCR. Além disso, duas amostras com RNA total extraído de integridade boa ( $\text{RIN} \geq 7$ ) e duas amostras com a integridade ruim ( $\text{RIN} < 7$ ) foram selecionadas para avaliar a interferência da qualidade do RNA na amplificação. Em ambas as condições, a concentração de cDNA total utilizada foi de 2 ng/ $\square\text{L}$ . Dessa forma, a reação de pré-amplificação (volume final 50  $\mu\text{L}$ ) foi realizada utilizando 12,5  $\mu\text{L}$  de cDNA, 25  $\mu\text{L}$  TaqMan PreAmp Master Mix e 12,5  $\mu\text{L}$  TaqMan® PreAmp Pool. As condições de amplificação realizadas foram: 95 °C por 10 minutos, 14 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos, 99°C por 10 minutos. As amostras de cDNA preamplificadas foram armazenadas em freezer -80°C até o uso.

#### **4.7.4 Ensaio OpenArray**

Um painel com 112 alvos foi predefinido para avaliação da expressão

gênica de ativação de células T e B pelo ensaio Taqman OpenArray. Os genes alvos específicos de células T, células B e de outras células envolvidas na resposta imune, bem como os genes referência, selecionados a partir do GenBank, estão demonstrados na tabela 1. Inicialmente, as amostras de cDNA pré-amplificadas foram diluídas 1:20 com tampão TE (Buffer TE, ThermoFisher). Cada reação de amplificação do ensaio de Open Array continha: 2,5 µL da amostra pré-amplificada diluída 1:20 e 2,5 µL de 2x TaqMan Open-Array Real-Time PCR Master Mix para o volume final da reação de 5 µL. As amostras foram adicionadas em triplicata em placas de PCR de 96 poços sobre o gelo. A pipetagem das amostras para a placa TaqMan OpenArray foi realizada pelo sistema AccuFill e a amplificação realizada no termociclador de PCR em tempo real QuantStudio12K.

**Tabela 1-** Alvos de ativação de células T e B avaliados na análise do perfil de expressão gênica pelo ensaio de *Open Array*.

| Name   | Gene ID          | GenBank ID | Name   | Gene ID       | GenBank ID |
|--|------------------|------------|--|---------------|------------|
| Early Growth Response 1                        | <b>EGR1</b>      | 1958       | C-C Motif Chemokine Receptor 4                 | <b>CCR4</b>   | 1233       |
| Toll Like Receptor 4                           | <b>TLR4</b>      | 7099       | Activation Induced Cytidine Deaminase          | <b>AICDA</b>  | 57379      |
| PR/SET Domain 1                                | <b>PRDM1</b>     | 639        | Nuclear Factor Kappa B Subunit 1               | <b>NFKB1</b>  | 4790       |
| BCL6 Transcription Repressor                   | <b>BCL6</b>      | 604        | MHC Class I Polypeptide-Related Sequence B     | <b>MICB</b>   | 4277       |
| Interleukin 12 Receptor Subunit Beta 2         | <b>IL12RB2</b>   | 3695       | Ubiquitin C                                    | <b>UBC</b>    | 7316       |
| Lymphocyte Activating 3                        | <b>LAG3</b>      | 3902       | Syndecan 1                                     | <b>SDCL</b>   | 6382       |
| Fas Cell Surface Death Receptor                | <b>FAS</b>       | 355        | Dipeptidyl Peptidase 4                         | <b>DPP4</b>   | 1803       |
| CD40 Ligand                                    | <b>CD40LG</b>    | 959        | SLAM Family Member 7                           | <b>SLAMF7</b> | 57823      |
| Interleukin 4 Receptor                         | <b>IL4R</b>      | 3666       | Interleukin 2 Receptor Subunit Alpha           | <b>IL2RA</b>  | 3659       |
| C-X-C Motif Chemokine Ligand 1                 | <b>CX3CL1</b>    | 6376       | POU Class 2 Homeobox 2                         | <b>POU2F2</b> | 5452       |
| BLM RecQ Like Helicase                         | <b>BLM</b>       | 641        | C-C Motif Chemokine Receptor 1                 | <b>CCR1</b>   | 1230       |
| Interleukin 1 Beta                             | <b>IL1B</b>      | 3653       | Colony Stimulating Factor 2                    | <b>CSF2</b>   | 1437       |
| C-X-C Motif Chemokine Ligand 8                 | <b>CXCL8</b>     | 3676       | BTB Domain And CNC Homolog 2                   | <b>BACH2</b>  | 60468      |
| Interleukin 2                                  | <b>IL2</b>       | 3658       | CD1d Molecule                                  | <b>CD1D</b>   | 912        |
| Interleukin 3                                  | <b>IL3</b>       | 3662       | Interleukin 10                                 | <b>IL10</b>   | 3686       |
| Interleukin 4                                  | <b>IL4</b>       | 3665       | CD3 Gamma Subunit Of T-Cell Receptor Complex   | <b>CD3G</b>   | 917        |
| CD3 Delta Subunit Of T-Cell Receptor Complex   | <b>CD3D</b>      | 915        | Interleukin 6                                  | <b>IL6</b>    | 3669       |
| Interleukin 7                                  | <b>IL7</b>       | 3674       | CD276 Molecule                                 | <b>CD276</b>  | 80381      |
| Interleukin 13                                 | <b>IL13</b>      | 3696       | Interferon Gamma                               | <b>IFNG</b>   | 3458       |
| CD81 Molecule                                  | <b>CD81</b>      | 975        | Transforming Growth Factor Beta 1              | <b>TGFB1</b>  | 7040       |
| CD8b Molecule                                  | <b>CD8B</b>      | 926        | CD40 Molecule                                  | <b>CD40</b>   | 958        |
| Interferon Regulatory Factor 8                 | <b>IRF8</b>      | 3394       | Interleukin 15                                 | <b>IL15</b>   | 3600       |
| Interleukin 18 Receptor 1                      | <b>IL18R1</b>    | 8809       | CD28 Molecule                                  | <b>CD28</b>   | 940        |
| Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase | <b>MAP3K7</b>    | 6885       | Interleukin 12B                                | <b>IL12B</b>  | 3693       |
| LCK Proto-Oncogene                             | <b>LCK</b>       | 3932       | Tumor Protein P53                              | <b>TP53</b>   | 7157       |
| B Cell Linker                                  | <b>BLNK</b>      | 29760      | Interleukin 18                                 | <b>IL18</b>   | 3606       |
| CD47 Molecule                                  | <b>CD47</b>      | 961        | Toll Like Receptor 6                           | <b>TLR6</b>   | 10333      |
| Fas Ligand                                     | <b>FASLG</b>     | 356        | Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1       | <b>VAV1</b>   | 7409       |
| Importin 8                                     | <b>IPO8</b>      | 10526      | CD80 Molecule                                  | <b>CD80</b>   | 941        |
| CD7 Molecule                                   | <b>CD7</b>       | 924        | Interleukin 11                                 | <b>IL11</b>   | 3689       |
| TNF Superfamily Member 13b                     | <b>TNFSF13B</b>  | 10673      | Interferon Regulatory Factor 4                 | <b>IRF4</b>   | 3662       |
| T-Box Transcription Factor 21                  | <b>TBX21</b>     | 30009      | CD4 Molecule                                   | <b>CD4</b>    | 920        |
| CD5 Molecule                                   | <b>CD5</b>       | 921        | CD3 Epsilon Subunit Of T-Cell Receptor Complex | <b>CD3E</b>   | 916        |
| Interleukin 21 Receptor                        | <b>IL21R</b>     | 50615      | Interleukin 12A                                | <b>IL12A</b>  | 3692       |
| Interleukin 21                                 | <b>IL21</b>      | 59067      | Nitric Oxide Synthase 2                        | <b>NOS2</b>   | 4843       |
| GATA Binding Protein 3                         | <b>GATA3</b>     | 2625       | Forkhead Box P3                                | <b>FOXP3</b>  | 50943      |
| X-Box Binding Protein 1                        | <b>XBP1</b>      | 7494       | Adenosine Deaminase                            | <b>ADA</b>    | 100        |
| Glucuronidase Beta                             | <b>GUSB</b>      | 2990       | Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1       | <b>HPRT1</b>  | 3251       |
| CD2 Molecule                                   | <b>CD2</b>       | 914        | Interleukin 5                                  | <b>IL5</b>    | 3667       |
| CD8a Molecule                                  | <b>CD8A</b>      | 925        | CD86 Molecule                                  | <b>CD86</b>   | 942        |
| C-C Motif Chemokine Receptor 3                 | <b>CCR3</b>      | 1232       | APC Regulator Of WNT Signaling Pathway         | <b>APC</b>    | 324        |
| Inducible T Cell Costimulator Ligand           | <b>ICOSLG</b>    | 23308      | Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 2 | <b>RIPK2</b>  | 8767       |
| Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A           | <b>CDKN1A</b>    | 1026       | NCK Adaptor Protein 1                          | <b>NCK1</b>   | 4690       |
| Toll Like Receptor 9                           | <b>TLR9</b>      | 54106      | C-X-C Motif Chemokine Receptor 3               | <b>CXCR3</b>  | 2833       |
| Metastasis Associated 1 Family Member 3        | <b>MTA3</b>      | 57504      | Toll Like Receptor 2                           | <b>TLR2</b>   | 7097       |
| CD27 Molecule                                  | <b>CD27</b>      | 939        | Recombination Activating 1                     | <b>RAG1</b>   | 5896       |
| Toll Like Receptor 1                           | <b>TLR1</b>      | 7096       | Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C   | <b>PTPRC</b>  | 5788       |
| Interleukin 12 Receptor Subunit Beta 1         | <b>IL12RB1</b>   | 3694       | C-C Motif Chemokine Ligand 3                   | <b>CCL3</b>   | 6348       |
| C-X-C Motif Chemokine Receptor 5               | <b>CXCR5</b>     | 643        | C-C Motif Chemokine Receptor 5                 | <b>CCR5</b>   | 1234       |
| TNF Superfamily Member 14                      | <b>TNFSF14</b>   | 8740       | Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit PO     | <b>RPLP0</b>  | 6175       |
| Membrane Spanning 4-Domains A1                 | <b>MS4A1</b>     | 931        | Actin Beta                                     | <b>ACTB</b>   | 60         |
| TNF Receptor Superfamily Member 13C            | <b>TNFRSF13C</b> | 115650     | Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase       | <b>GAPDH</b>  | 2597       |
| C-X-C Motif Chemokine Receptor 4               | <b>CXCR4</b>     | 7852       | Phosphoglycerate Kinase 1                      | <b>PGK1</b>   | 5230       |
| BCL2 Apoptosis Regulator                       | <b>BCL2</b>      | 596        | Beta-2-Microglobulin                           | <b>B2M</b>    | 567        |
| Hydroxymethylbilane Synthase                   | <b>HMBS</b>      | 3145       | Suppressor Of Cytokine Signaling 1             | <b>SOC31</b>  | 8651       |
| C-C Motif Chemokine Receptor 2                 | <b>CCR2</b>      | 729230     | CD274 Molecule                                 | <b>CD274</b>  | 29126      |

**Fonte:** criado pelo autor.

Os valores de *Relative threshold cycles* (CRT) das amostras foram normalizados a partir de três genes constitutivos envolvidos no painel (HPRT1, UBC e IPO8) que apresentaram *score* menor que 1 (*score* <1). Em seguida, foi feita a análise de componente principal (PCA) seguida de um agrupamento hierárquico a partir dos valores de CRT individuais de cada biogrupo (RE e NR) para os genes avaliados. Esta análise foi realizada a priori com o objetivo de identificar e remover possíveis outliers do cálculo da Quantificação Relativa (RQ) e assim, obter dados mais homogêneos dos grupos biológicos (Jaskowiak, 2011). A análise de PCA foi feita utilizando o GraphPad Prism 9 e o agrupamento hierárquico das amostras o Software R. A partir das análises, foram identificados seis indivíduos outliers, sendo três do grupo RE (RP516, RP517 e RP308) e três NR (RP624, RP550 e RP623). Dessa forma, para o cálculo da RQ foram consideradas 14 amostras agrupadas nos grupos biológicos RE (n=7) e NR (n=7).

#### **4.8 Análise estatística**

Todos os dados demográficos, epidemiológicos, clínicos e de sorologia foram adicionados no banco de dados da população do estudo. As análises estatísticas foram realizadas no programa Prism 9.0 (GraphPad software). Inicialmente, o teste de Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar a normalidade das variáveis. O teste de Grubb foi realizado para detectar *outliers*. Os resultados da resposta de anticorpos foram utilizados como uma variável categórica binária (positivo e negativo) e/ou como uma variável contínua (nível de anticorpos expressos como Índice de Reatividade, IR). As diferenças nas proporções foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou teste exato de Fisher, conforme apropriado. As diferenças nas médias e/ou medianas foram avaliadas usando de test T ou Mann-Whitney para dois grupos e ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis para mais de dois grupos seguido de teste post hoc, conforme apropriado. Em todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%, ou seja, valor de  $p < 0,05$ . A análise de enriquecimento funcional dos genes diferencialmente expressos (DEGs) foi realizada utilizando o programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) considerando nível de

significância de 5% ( $p < 0,05$ ) e expressos em *heatmap* construído no programa GraphPad Prism 9. Foram consideradas vias funcionalmente enriquecidas significativas aquelas que apresentaram valores de  $p < 0,01$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características gerais da população do estudo

Um total de 210 indivíduos foram recrutados para o estudo, sendo que 48% (101/ 210) já haviam participado em estudo anterior (antigos participantes) e 52% (109/ 210) são novos participantes. As características demográficas, epidemiológicas e de infecção malárica da população do estudo estão demonstrados na tabela 2. No geral, a população estudada é constituída de adultos com mediana de idade de 43,8 anos (intervalo interquartil – IIQ: 30,3 – 57,4). A mediana de idade entre os novos (NP) e antigos (AP) participantes foram semelhantes de 40,9 anos (30,1- 56,2) e 46,4 anos (32,7– 60,0), respectivamente. Em relação ao gênero, a proporção de homem e mulher foi de 1,1:1 tanto para a população geral, como para ambos os grupos. Em relação ao tempo de residência em Rio Pardo, como esperado, foi possível observar que indivíduos NP tiveram menor de tempo de residência quando comparado aos indivíduos AP (NP 5 anos versus AP 19 anos,  $p=0,003$ ). Quanto ao local de moradia, a frequência de moradores em área de igarapé foi semelhante entre os grupos NP e AP (38,5% NP versus 41,6 % AP).

No geral, a frequência de infecção por malária na população de estudo foi de 5% (11/ 210). Todos os 11 indivíduos tiveram diagnóstico de infecção malária positiva pela PCR em tempo real (Amaral et al., 2019), e em apenas dois indivíduos do grupo NP, o diagnóstico foi confirmado pelo diagnóstico microscópico. Como esperado, a frequência de infecção malárica foi menor nos indivíduos AP (n=4) quando comparado com os NP (n=7). Além disso, no grupo dos AP foram positivos somente pelo diagnóstico molecular, sugerindo baixas parasitemias.

**Tabela 2-** Características demográficas, epidemiológicas e infecção malárica da população do estudo.

| Variáveis  | Participantes              |                               | Total<br>(N=210)   |
|--|----------------------------|-------------------------------|--------------------|
|  | Novos (NP)<br>(N=109)      | Antigos(AP)<br>(N=101)        |                    |
| Idade (mediana, IIQ)                                 | 40,9 (30,1-56,2)           | 46,4 (32,7-60,0)              | 43,8 (30,3 – 57,4) |
| Gênero, masculino:<br>feminino                       | 1,1:1                      | 1,1:1                         | 1,1:1              |
| Anos de residência em<br>Rio Pardo<br>(mediana, IIQ) | 5,0 (2,0-9,0) <sup>a</sup> | 19,0 (15,0-21,0) <sup>b</sup> | 13,0 (5,0-20,0)    |
| População<br>Ribeirinha (%)**                        | 42 (38,5)                  | 42 (41,6)                     | 84 (40,0)          |
| Infecção por malária,<br>total (%)                   | 7 Pv (6)                   | 4 Pv (4)                      | 11 Pv (5)          |
| Microscopia  | 2 Pv (2)                   | 0 (0)                         | 2 Pv (1)           |
| real-time PCR  | 7 Pv (6)                   | 4 Pv (4)                      | 11 Pv (5)          |

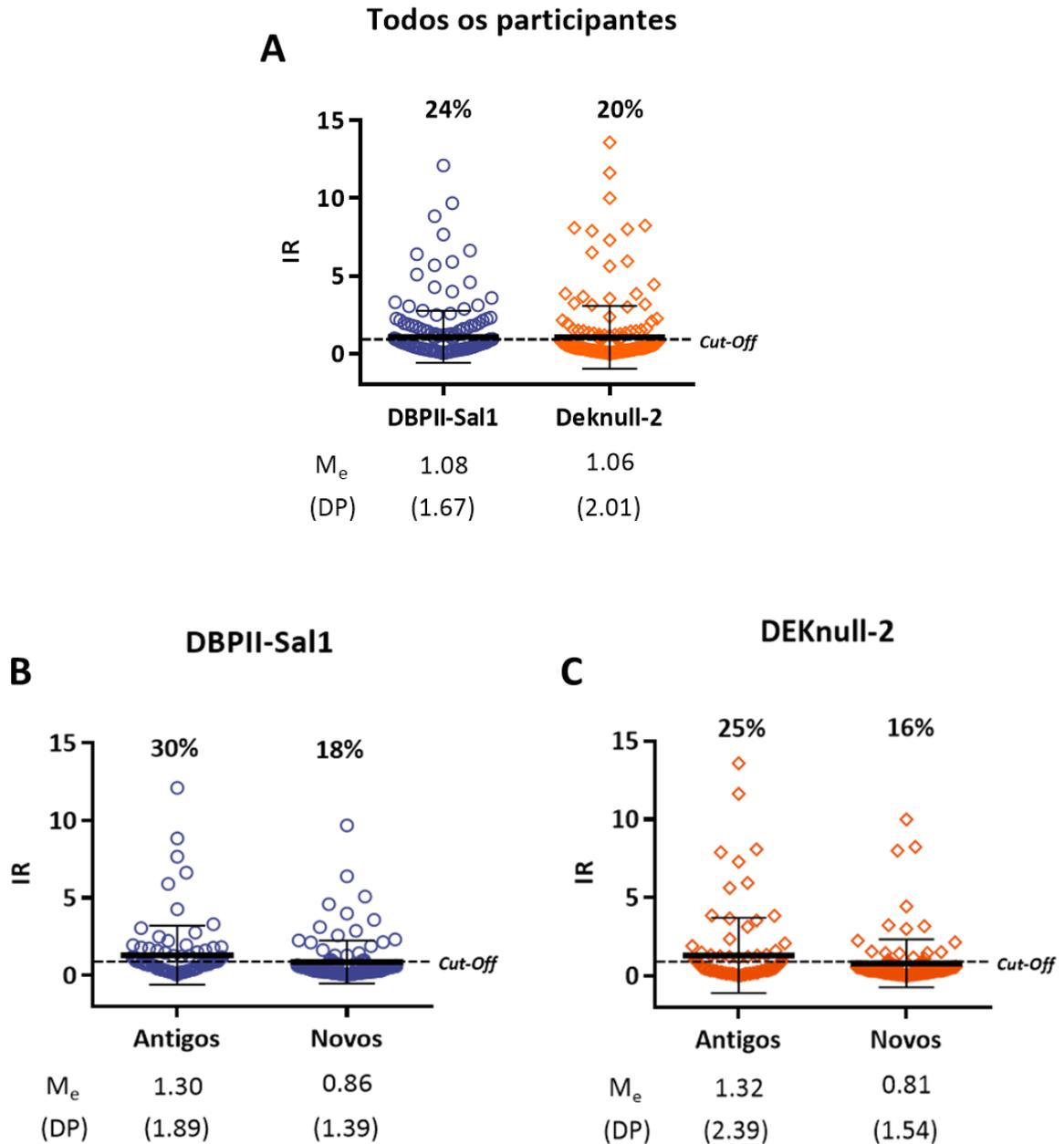
IIQ = Intervalo interquartil; Pv – *Plasmodium vivax*; PCR em tempo real (Amaral et al., 2019); \*\* moradores em área de Igarapé; <sup>a-b</sup> Letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05).

**Fonte:** criado pelo autor.

## 5.2 Frequência de anticorpos IgG contra DBP<sub>II</sub> Sal-1 e DEKnull-2 na população do estudo

As frequências de anticorpos IgG contra DBP<sub>II</sub>-Sal1 e ao antígeno sintético DEKnull-2 em 210 indivíduos foram de 24% (50/ 210) e 20% (42/ 210), respectivamente (Figura 7A). Quando comparamos as frequências de respondedores entre novos (NP) e antigos participantes (AP), a positividade para DBP<sub>II</sub>-Sal1 em AP foi de 30% (30/101) e enquanto em NP foi de 18% (20/109) (Figura 7B). Resultados similares foram observados para DEKnull-2, onde 25% (25/101) de AP apresentaram frequência de IgG positiva enquanto em NP foi de 16% (17/109). Não houve diferença estatística entre a positividade e nos níveis de anticorpos nos grupos para ambas as proteínas (Figura 7C).

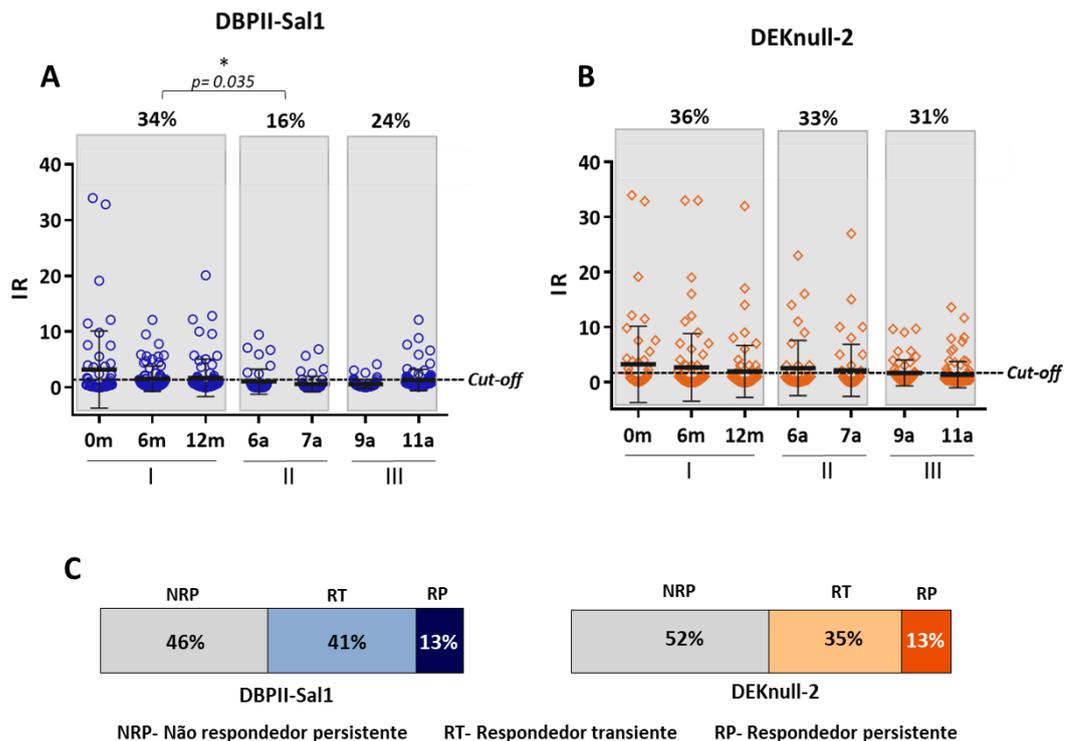
**Figura 7. Frequência de anticorpos IgG total contra os antígenos de *P. vivax* na população de estudo de Rio Pardo.** (A) Resposta de anticorpos IgG contra DBP<sub>II</sub> Sal1 e DEKnull-2 na população do estudo (N=210) e (B) contra DBP<sub>II</sub> Sal1 e (C) DEKnull-2 em novos (N=109) e antigos (N=101) participantes. Os resultados foram expressos em índice de reatividade (IR) para cada proteína. As linhas horizontais indicam a média e o desvio padrão dos valores de IR. A linha pontilhada indica o ponto de corte (*cut-off*). Valores de IR >1 foram considerados positivos. A frequência de respondedores (%) se encontra no topo da figura. A média (Me) e desvio padrão (DP) do índice de reatividade estão representados no eixo x.



**Fonte:** criado pelo autor.

Com o objetivo de avaliar a dinâmica da resposta de anticorpos contra a DBP<sub>II</sub> e DEKnull-2 ao longo de 11 anos, os resultados acima apresentados foram analisados em conjunto com as frequências de anticorpos obtidos nos anos 1, 6, 7 e 9 do estudo retrospectivo (Figura 8). Durante todo o período de acompanhamento, diferentes perfis de transmissão de malária foi observado na área de estudo como fase de média transmissão (fase I e III) e baixa transmissão (fase II). Neste período, as frequências médias da resposta de anticorpos IgG antígeno-específicos variaram de 16 a 34% contra DBP<sub>II</sub> (Figura 8A) e 31 e 36% contra DEKnull-2 (Figura 8B). No período de baixa transmissão de malária (Fase II) que coincide com o 6<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> ano de acompanhamento, a frequência de anticorpos contra DEKnull-2 permaneceu estável em torno de 33%, enquanto houve uma redução de positividade para DBP<sub>II</sub>-Sal1 para 16% ( $p < 0,01$ ). No entanto, com o retorno de transmissão de malária (Fase III), a frequência de respondedores aumentou para 24% (Figura 8A).

**Figura 8. Dinâmica da resposta de anticorpos antígeno-específicos durante 11 anos de acompanhamento.** (A) Dinâmica da resposta de anticorpos IgG total contra DBP<sub>II</sub>-Sal1 (azul) e (B) DEKnull-2 (laranja) da população do estudo no período de 11 anos, cujo estudo longitudinal está descrito na Figura 5. A resposta de IgG foi expressa em Índice de Reatividade (IR) e os valores individuais representados em pontos com as respectivas cores no eixo x. (C) Perfil da resposta de anticorpos contra DBP<sub>II</sub> (azul) e DEKnull-2 (laranja) entre os indivíduos durante o período do estudo, expressos em porcentagem (%) de respondedores.



Fonte: criado pelo autor.

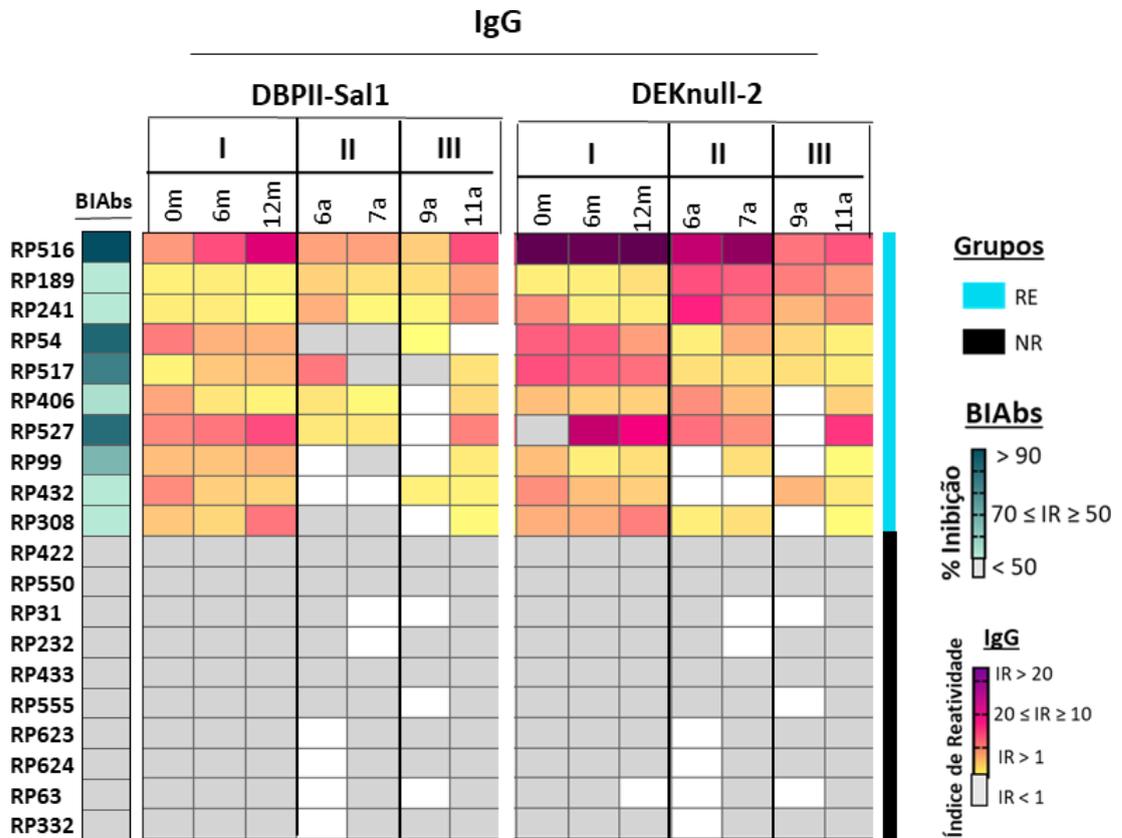
Com base nos resultados de 11 anos do estudo longitudinal, identificamos três perfis distintos da resposta de anticorpos IgG contra DBP<sub>II</sub>-Sal1 e DEKnull-2: **(1) Respondedor Persistente (RP)** – indivíduo com resposta de anticorpos IgG antígeno-específicos positiva em todo o período; **(2) Não Respondedores Persistentes (NRP)** – resposta de anticorpos IgG antígeno-específicos negativa em todo o período; **(3) Respondedores Transientes (RT)** – resposta de anticorpos IgG antígeno-específicos que variou entre positiva e negativa durante o período do estudo (Figura 7C). As frequências dos perfis de resposta de anticorpos para ambas as proteínas foram similares, sendo possível identificar 13% (13/101) de respondedores persistentes, tanto para DBP<sub>II</sub>-Sal1, quanto para DEKnull-2. Em relação à proporção de não respondedores persistentes, identificamos 46% (46/101) e 52% (52/101) para DBP<sub>II</sub>-Sal1 e DEKnull-2, respectivamente. Respondedores transientes foram identificados em 41% (41/101) para DBP<sub>II</sub>-Sal1 e 35% (35/101) para DEKnull-2.

### **5.3 Perfil de Resposta de anticorpos IgG totais antígeno-específicos de acordo com o *status* imunológico da resposta de anticorpos bloqueadores da interação DBP<sub>II</sub>-DARC (BIAbs) de longa duração**

Como a resposta de anticorpos bloqueadores da interação DBP<sub>II</sub>-DARC com alta inibição está associada com proteção clínica (KING et al., 2008; NICOLETI et al., 2016), avaliamos o plasma de indivíduos que apresentaram resposta de anticorpos bloqueadores da interação DBP<sub>II</sub>-DARC (BIAbs) em conjunto com a resposta persistente de anticorpos IgG total contra DBP<sub>II</sub> e DEKnull-2 (Figura 9). Dois grupos com indivíduos com perfil bastante distinto foram selecionados para investigar o perfil diferencial de expressão gênica de ativação de células T e B. O primeiro grupo, consistia de indivíduos com resposta positiva de BIAbs e resposta contra DBP<sub>II</sub> e DEKnull-2 persistente, denominados de Respondedor de elite (RE, n=10) e, o segundo grupo, não respondedor persistente (NR, n=10) era composto por indivíduos que não apresentavam BIAbs, nem resposta de IgG contra as proteínas avaliadas ao longo dos 11 anos de acompanhamento. A mediana da porcentagem de inibição de BIAbs dos RE foi de 59.2 (IIQ: 50-89.5) e todos os respondedores

apresentaram resposta de IgG positiva para, pelo menos, uma das proteínas avaliadas durante todo o período do estudo. Quando comparamos a intensidade da resposta de anticorpos, observamos que a intensidade foi maior para DEKnull-2 em comparação com a DBPII ( $p=0,02$ ), onde as medianas do índice de reatividade de anticorpos contra DEKnull-2 e DBPII foram de 5,0 (2,98-8,25) e 2,96 (1,6-5,9), respectivamente. Os NR não apresentaram resposta de BIAbs e IgG contra DBPII e DEKnull-2, como mostra a Figura 9.

**Figura 9- Perfil individual da resposta de anticorpos IgG total antígeno-específicos de acordo com o status imunológico da resposta de anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC (BIAbs) da população de estudo para avaliação do diferencial da expressão gênica de ativação de células B e T.** O estudo foi realizado em períodos de alta (I e III) e baixa (II) transmissão da malária, onde foram conduzidos: a fase I (zero, 6 e 12 meses), fase II (6º e 7º anos) e fase III (9 e 11 anos). Cada linha representa um indivíduo e as colunas indicam resposta de BIAbs (verde) e as respostas de IgG total detectadas pelo ELISA (rosa-amarelo) em cada momento da pesquisa transversal. Valores de IR > 1,0 foram considerados positivos e categorizadas em tercil do valor de IR (roxo a amarelo). Valores abaixo do ponto de corte foram considerados como negativos e estão representados pela cor cinza. A cor branca representa ausência de participação do estudo longitudinal de coorte aberta.



Fonte: criado pelo autor.

Para verificar a influência dos fatores demográficos e epidemiológicos no perfil de respondedores de elite e não respondedor persistente, a tabela 2 mostra as características dos grupos estudados. A mediana de idade entre respondedores de elite (RE) e não respondedores (NR) foi semelhante com 50 (43-62) e 54 (36-62) anos, respectivamente (Tabela 3). Em relação ao gênero, a proporção de homem e mulher também foi semelhante entre os grupos de 1:2 em RE e 1:1 em NR, bem como o tempo de residência em Rio Pardo (20% RE versus 18% NR). Quando avaliamos a proporção de indivíduos que residem em áreas de igarapé 50% dos RE residem nesta área quando comparado aos 30% de NR, embora não tenha havido diferença significativa ( $p=0,42$ ). Quando avaliamos o número prévio de episódios de malária entre os grupos, os respondedores de elite apresentaram maior número de episódios prévios de malária em comparação com os não-respondedores (14 RE versus 3 NR,  $p=0,02$ ). Quanto ao diagnóstico de malária, as infecções detectadas pela PCR em tempo real em todos os momentos do estudo, foram semelhantes entre os grupos (7 RE positivos versus 10 NRP positivos), sendo que em ambos os grupos, a infecção malárica não foi detectada pela microscopia.

**Tabela 3-** Características demográficas, epidemiológicas e de infecção malárica nos indivíduos selecionados para avaliação do perfil de expressão gênica de ativação de células T e B.

| Variáveis   | Participantes           |                      |
|---|-------------------------|----------------------|
|   | RE<br>(N=10)            | NR<br>(N=10)         |
| Idade (mediana, IIQ)                              | 50 (43-62)              | 54 (36-62)           |
| Gênero, masculino: feminino                       | 1:2                     | 1:1                  |
| Anos de residência em Rio Pardo<br>(mediana, IIQ) | 20 (19- 21)             | 18 (12-21)           |
| População ribeirinha (%)                          | 50                      | 30                   |
| Episódios de malária referida (mediana,<br>IIQ)   | 14 (11-19) <sup>a</sup> | 3 (2-8) <sup>b</sup> |
| Infecção por malária, total (n)                   | 7                       | 10                   |
| Real-time PCR (n)*                                | 7                       | 10                   |
| Microscopia                                       | 0                       | 0                    |

IIQ:interquartil; \*PCR em tempo real (protocolo de Amaral et al., 2019). <sup>a-b</sup> Letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p<0,05$ ).

## 5.4 Avaliação do perfil diferencial de expressão gênica de ativação de células T e B pelo ensaio de *Taqman Open Array*

Para identificar possíveis marcadores e/ou vias que possam explicar o estabelecimento do perfil de resposta encontradas em respondedores de elite, um painel de genes relacionados com a ativação de células T e B foi desenhado para o ensaio de *Taqman Open Array*. Primeiramente são apresentados os resultados das etapas de padronização do ensaio de *Taqman Open Array* com amostras controle e posteriormente, a avaliação do perfil de expressão gênica de amostras dos indivíduos RE e NR selecionados.

### 5.4.1 Escolha do protocolo da extração de RNA a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

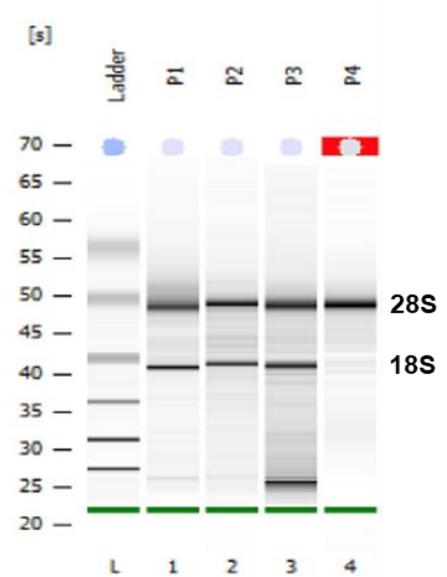
Inicialmente, o método de extração de RNA total a partir de um milhão ( $1 \times 10^6$ ) de PBMCs frescas estimuladas com mitógeno inomicina e PMA foi definido a partir de quatro protocolos distintos: (i) **P1**: kit RNAesy Plus Mini; (ii) **P2**: kit RNAesy Plus Mini modificado; (iii) **P3**: Trizol; (iv) **P4**: Trizol + kit RNAesy Plus Mini. O objetivo foi identificar o método de extração de RNA com quantidade e qualidade do RNA extraído adequado para os ensaios de *Taqman Open Array* para expressão gênica (Figura 10). A maior concentração de RNA total foi obtida pelo P3 (2,4  $\mu\text{g}$ ), seguido por P2 (1,5  $\mu\text{g}$ ), P4 (1,3  $\mu\text{g}$ ), e P1 (0,5  $\mu\text{g}$ ) (Figura 10A). No entanto, a avaliação da qualidade, por meio do número de integridade de RNA (RIN) de amostras de RNA extraídas em cada um dos quatro protocolos avaliados, mostrou o que a melhor integridade foi obtida pelo P1 (RIN=8,9), seguido por P2 (RIN=7,6) e P3 (RIN = 5,1). Em P4, apenas a banda 28S do RNA ribossomal (rRNA) apareceu, indicando que houve perda de integridade do RNA pela ausência da banda 18S do rRNA (Figura 10B). Neste caso, não foi possível calcular o valor de RIN. Com base nesses resultados, um novo experimento foi realizado com os P1 e P2 mostrando resultados similares. Desta forma, o protocolo P2 foi escolhido, pois possibilitou obtenção de RNA extraído em quantidade e qualidade indicado para uso no ensaio de expressão gênica pelo ensaio de *Taqman Open Array*.

**Figura 10- Comparação de quatro protocolos distintos de extração de RNA total a partir de PBMC frescas estimuladas de amostras controles.** (A) Quantidade ( $\square$ g) e número de integridade de RNA (RIN) de RNA total extraído a partir de  $1 \times 10^6$  PBMC estimuladas com PMA + Ionomicina para cada protocolo. (B) Avaliação da integridade pela eletroforese de RNA total extraído obtido a partir de diferentes protocolos de extração (P1, P2, P3 e P4). L: padrão (RNA ladder). As bandas 18S e 28S do rRNA estão indicadas na figura. A dosagem do RNA total foi mensurada pelo Qubit RNA HS Assay (\*). A qualidade do RNA total foi avaliada utilizando Agilent RNA 6000 Pico Assay (\*\*).

**A**

| Método | RNA ( $\mu$ g)* | RIN ** |
|--------|-----------------|--------|
| P1     | 0,5             | 8,9    |
| P2     | 1,5             | 7,6    |
| P3     | 2,4             | 5,1    |
| P4     | 1,3             | N/A    |

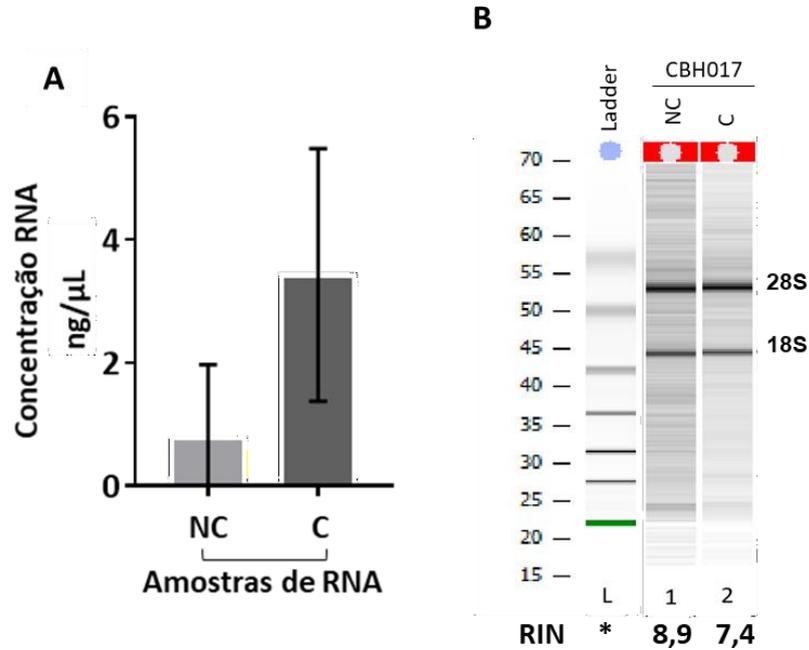
**B**



**Fonte:** criado pelo autor.

A quantidade de RNA necessária em 10  $\mu$ L na reação de transcrição reversa (10  $\mu$ L do RNA e 10  $\mu$ L do RT Master Mix) é de 40 ng para obtenção de cDNA. No entanto, a quantidade média de RNA total obtida para 10  $\mu$ L foi de 35 ng a partir do protocolo de extração de RNA selecionado. Dessa forma, o segundo passo importante foi concentrar as amostras de RNA extraídas no *Speed Vacuum*, a fim de obter a concentração de RNA mínima, indicada pelo protocolo do fabricante para a obtenção concentração de RNA necessária. Com a redução em cerca de 50% do volume inicial do RNA extraído pelo *Speed Vacuum*, foi possível aumentar a concentração média de 0,78 ng/ $\square$ L para 3,43 ng/ $\square$ L (Figura 11A). Em função disso, avaliamos novamente o número de integridade de RNA (RIN) com as respectivas bandas do RNA extraído por eletroforese (Bioanalyzer 2100) antes e após a concentração para confirmar que o processo de concentração não influenciaria na qualidade das amostras do RNA extraído. Foi possível observar que as bandas 28s e 18s do rRNA permaneceram íntegras pela eletroforese (Figura 11B).

**Figura 11- Avaliação da quantidade e qualidade do RNA extraído antes e após a concentração das amostras em *Speed Vacuum*.** (A) Quantificação do RNA total extraído antes (cinza claro) e após (cinza escuro) concentração pelo método de Qubit (Thermofisher). (B) Análise qualitativa de RNA total extraído de amostra (CBH017) antes (1) e após (2) concentração pela eletroforese com os respectivos valores de RIN (do inglês, *RNA integrity number*) obtida com o kit da Agilent RNA 6000 Pico Assay. NC = não concentrada; C= concentrada



Fonte: criado pelo autor.

A quantificação e a qualidade das amostras de RNA extraídas antes e após concentradas estão mostradas na Tabela 4. A quantidade e qualidade do RNA variaram após o processo de concentração. No entanto, todas as amostras concentradas apresentaram valor de RIN  $\geq 6,5$  indicando ser aceitável para uso no ensaio *Taqman Open Array*, segundo indicado pelo fabricante que recomenda amostras de RNA com RIN  $\geq 5$ . Assim, o próximo passo foi avaliar se haveria influência da concentração da amostra no *Speed Vacuum*, bem como a qualidade do RNA, nas próximas etapas do ensaio de expressão gênica pelo *Taqman Open Array*.

**Tabela 4-** Concentração do RNA extraído (ng/□L) e número de integridade de RNA (RIN) em amostras não concentradas e concentradas pelo *Speed Vacuum* obtidas a partir de PBMC de amostras controle.

| Amostra | Não concentrada |        | Concentrada  |        |
|---------|-----------------|--------|--------------|--------|
|         | RNA (ng/μL)*    | RIN ** | RNA (ng/μL)* | RIN ** |
| CBH05   | 2,2             | 9,1    | 5,8          | 8,5    |
| CBH017  | 0               | 8,9    | 4,6          | 7,4    |
| CBH06   | 1,0             | 7,0    | 3,4          | 6,5    |
| CBH03   | 3,0             | 8,5    | 6,2          | 7,2    |
| CBH010  | 0               | 8,0    | 2,2          | 6,8    |
| CBH08   | 0               | 7,3    | 2,9          | 6,7    |
| CBH02   | 0               | 9,4    | 2,0          | 8,0    |
| CBH013  | 0               | 7,6    | 2,3          | 6,9    |

\* Qubit® RNA HS Assay. \*\* Agilent RNA 6000 Pico Assay

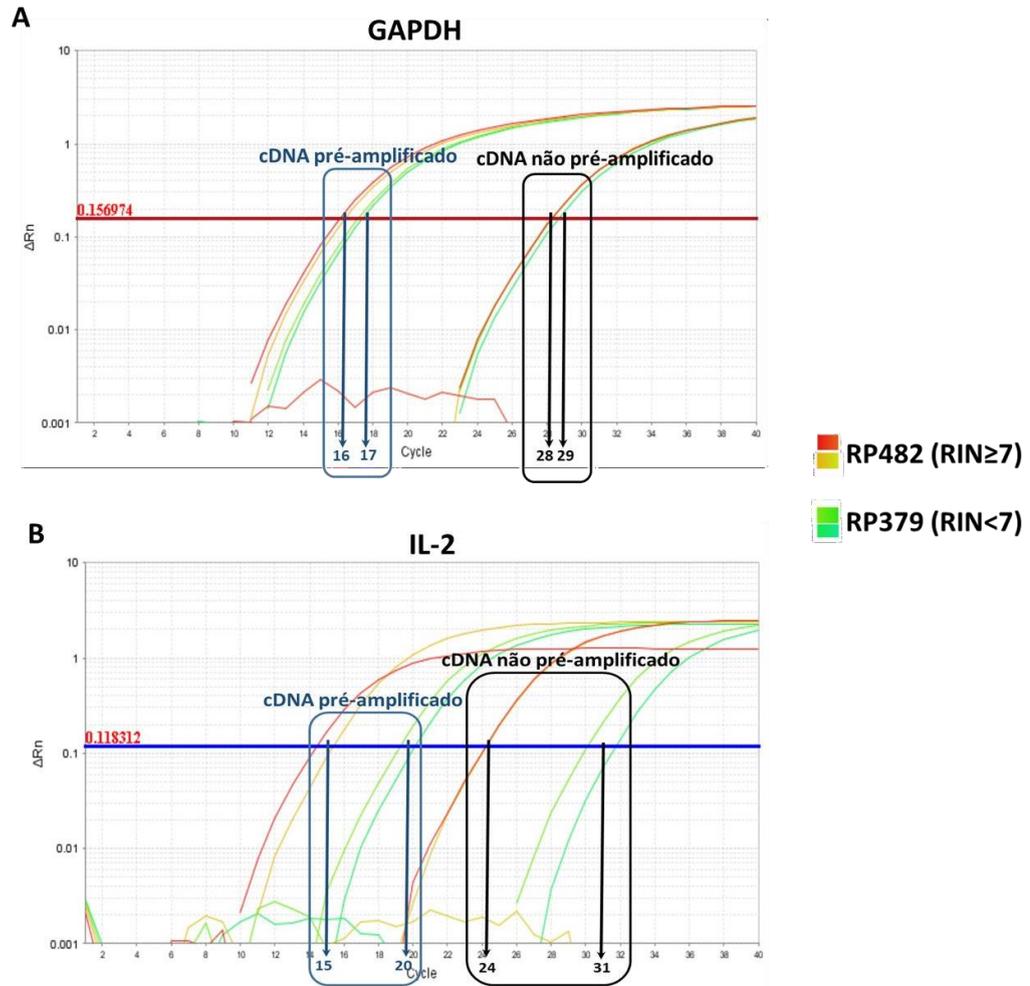
#### 5.4.2 Inclusão da etapa de pré-amplificação do cDNA para o ensaio de expressão gênica

O próximo passo foi avaliar a necessidade de adicionar a etapa de pré-amplificação de cDNA antes do uso no ensaio de expressão gênica pelo *Taqman Open Array*. Para isso, foram avaliadas a amplificação de dois genes de alta expressão (GAPDH) e baixa expressão (IL-2) com as mesmas quantidades de RNA. Não houve diferença na amplificação do gene GAPDH entre as amostras com valor de RIN maior ou igual a 7 (RP482) e amostra com RIN menor que 7 (RP379) com os valores de CQ de 28 e 29, respectivamente (Figura 12A). Resultados semelhantes entre amostras com integridade boa (RIN  $\geq 7$ ) e ruim (RIN  $< 7$ ) submetidas à pré- amplificação foram de CQ de 16 e 17, respectivamente (Figura 12A). Importante ressaltar que embora o número de ciclos entre as amostras com integridade distintas foi semelhante, a inclusão da etapa de pré-amplificação reduziu aproximadamente dez ciclos de amplificação.

Por outro lado, a qualidade do RNA, mensurada pelo número de integridade (RIN) influenciou na amplificação do gene com baixa expressão (IL-2), onde observou-se que na amostra com RIN maior ou igual a 7 (RP482) e RIN  $< 7$  (RP379) apresentaram valor de CQ de 24 e 31, respectivamente, indicando uma diferença de sete ciclos. Resultados similares foram observados com a amplificação do gene IL-2 com uso de amostras pré-amplificadas de integridade boa (R482) e ruim (RP379) que apresentaram CQ de 15 e 20,

respectivamente. No entanto, houve uma redução de cinco ciclos da diferença entre o uso de amostras pré-amplificadas com integridade distinta. Além disso, observamos uma redução em cerca de nove ciclos de amplificação com o uso de amostras submetidas à pré-amplificação quando comparadas com o uso de amostras não submetidas à pré-amplificação (Figura 12B). Em conjunto, esses dados indicam que a inclusão da etapa de pré-amplificação amenizou a limitação da quantidade e qualidade de RNA extraído disponível para realização do ensaio que tem alvos com diferentes níveis de expressão.

**Figura 12-** Avaliação da amplificação dos genes de referência GAPDH (A) e IL-2 (B) em amostra com a integridade distinta por qPCR. Duplicatas da amostra de RNA com integridade boa (RIN  $\geq 7$ , amostra RP482), indicada pelas linhas vermelha e amarela, e com integridade ruim (RIN  $< 7$ , RP379), indicada pelas linhas verdes escura e clara. As amostras submetidas à pré-amplificação estão destacadas dentro do retângulo azul e as amostras sem pré-amplificação estão destacadas dentro do retângulo preto. As linhas verticais em azul indicam o CQ de cada uma das amostras. O eixo y indica o valor de delta Rn ( $\Delta Rn$ ), e o eixo x o número de ciclos. As linhas horizontais vermelha e azul indicam o Threshold para os genes GAPDH e IL-2, respectivamente.

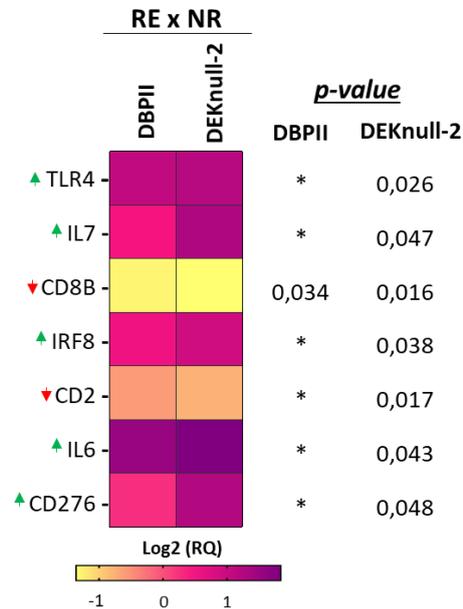


Fonte: criado pelo autor.

### 5.4.3 Avaliação do diferencial de expressão gênica de ativação de células T e B em respondedores de elite e não respondedores.

Após a pré-amplificação, as amostras foram amplificadas em triplicata pelo ensaio de *Taqman Open Array* para avaliação do perfil de expressão gênica de ativação de células B e T nos grupos com perfis distintos de resposta para DBPII e DEKnull-2. Inicialmente, o cálculo de Quantificação Relativa (RQ) entre o grupo RE e NR sob estímulo com os antígenos de *P. vivax* (DBPII-Sal1 e DEKnull-2) foi feito a fim de se avaliar o diferencial de expressão gênica em PBMC de respondedores de elite (RE) em comparação com não-respondedores (NR). Dos 112 genes avaliados relacionados com a ativação de células T e B, sete genes foram diferencialmente expressos após estímulo com DEKnull-2, enquanto que apenas um gene foi diferencialmente expresso após estímulo com DBPII ( $p < 0,05$ ) (Figura 13). Dos sete genes diferencialmente expressos (DEGs) sob estímulo-específico de DEKnull-2, cinco genes (TLR4, IL7, IRF8B, IL6 e CD276) tinham expressão aumentada, enquanto dois genes (CD8B e CD2) tiveram expressão diminuída. O único DEG para DBPII (CD8B) também foi diferencialmente expresso para DEKnull-2, apresentando expressão reduzida para ambas as proteínas. Dessa forma, ao todo cinco DEGs apresentaram expressão aumentada e dois DEGs tiveram expressão reduzida.

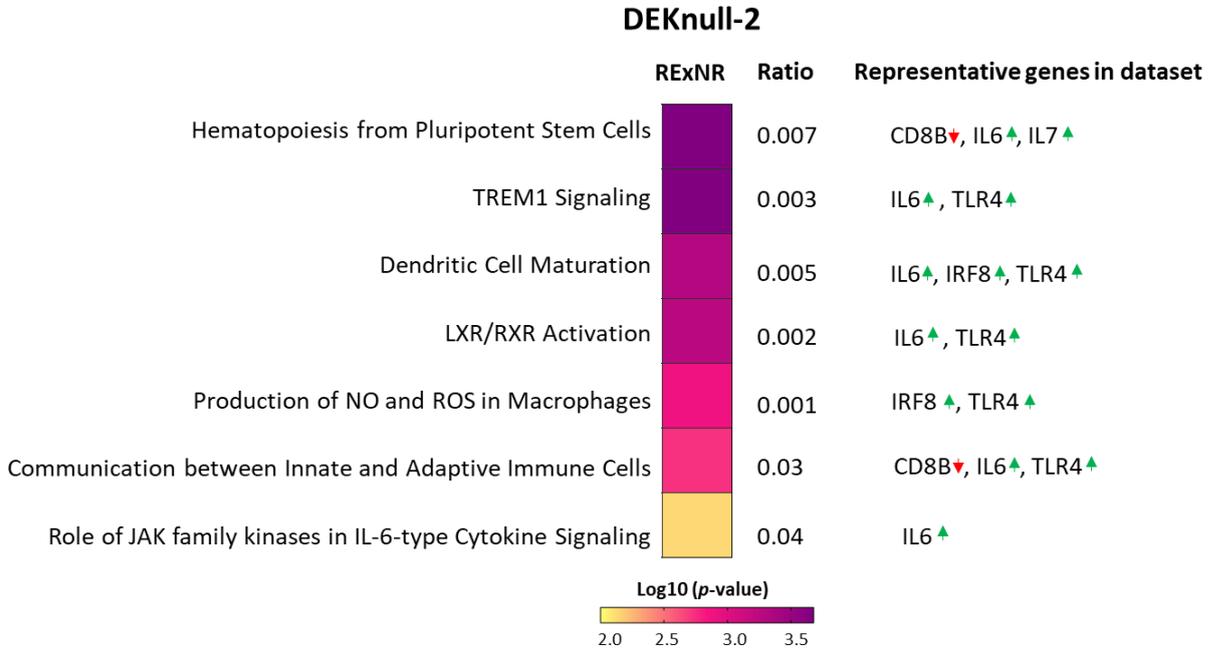
**Figura 13-** Mapa de calor representado com os valores de Log2 RQ dos genes diferencialmente expressos (DEGs) em indivíduos respondedores de elite (RE) estimulados com DBP11 e DEKnull-2, com seus respectivos valores de  $p < 0,05$  indicados à direita. As setas para cima indicam aumento da expressão e setas para baixo indicam expressão gênica reduzida.



**Fonte:** criado pelo autor.

Para identificar e entender as vias induzidas em respondedores de elite em comparação com os não respondedores, a análise de enriquecimento funcional pelo IPA dos sete genes diferencialmente expressos, identificou sete vias canônicas significativamente enriquecidas apenas para DEKnull-2 ( $p < 0,01$ ) (Figura 14). As vias de sinalização da proteína TREM1 (do inglês, *triggering receptor expressed on myeloid cells 1*) e ativação de receptor X hepático (LXR/RXR), envolvem a participação dos genes IL6 e TLR4. Estes genes também participam da via de maturação de células dendríticas e comunicação de células da resposta imune inata e resposta adaptativa, em conjunto com o gene IRF8 e CD8B, respectivamente. A via de hematopoiese a partir de células-tronco pluripotentes envolve a participação de CD8B, IL-6 e IL-7. Os genes TLR4 e IRF8, participam da via de produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos. Além disso, a sinalização da família JAK também foi identificada como significativa e envolve a expressão de IL-6.

**Figura 14-** Mapa de calor indicando as vias canônicas funcionalmente enriquecidas para respondedores de elite para DEKnull-2 ( $p < 0,01$ ) com os respectivos genes diferencialmente expressos (DEGs) envolvidos em cada via indicada à direita. As setas para cima indicam aumento da expressão e setas para baixo indicam expressão gênica reduzida.



**Fonte:** criado pelo autor.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Perfil da resposta imune humoral contra DBPII e DEKnull-2 em um estudo longitudinal de longa duração em indivíduos de área endêmica para a malária

A busca por uma vacina eficaz contra *P. vivax* visa contribuir no controle e eliminação da malária, no entanto, apresenta desafios pela complexidade biológica dessa espécie, além de demandar uma compreensão dos mecanismos envolvidos no estabelecimento de uma imunidade naturalmente adquirida (INA) sólida e duradora (ADDAI-MENSAH et al., 2016; CASTRO et al., 2006; LIMA-JUNIOR et al., 2008, 2012; WERNSDORFER, 1981; LANGHORNE, 2008). Contudo, a maior parte destes estudos sobre a compreensão dos mecanismos envolvidos na geração e duração da resposta imune na malária são voltados para a espécie *P. falciparum*, uma espécie biológica e imunologicamente distinta de *P. vivax*.

Neste trabalho, avaliamos o perfil da resposta imune humoral contra o principal antígeno de fase sanguínea candidato à vacina de *P. vivax* (DBPII) e seu antígeno vacinal sintético (DEKnull-2), desenvolvido com o objetivo de se aprimorar a DBPII, e fazer com que haja a indução da produção de anticorpos que sejam capazes de neutralizar a interação DBPII-DARC entre diferentes variantes de DBPII (NTUMNGIA e ADAMS, 2017). Os resultados anteriores do nosso grupo são bastante promissores, pois DEKnull-2 foi altamente reconhecido na população com histórico de longa exposição à malária na Amazônia brasileira e a resposta de anticorpos foi estável ao longo de nove anos (NUTMNGIA et al., 2017, PIRES et al., 2018), como os resultados aqui apresentados. Além disso, anticorpos IgG direcionados aos epítomos conservados (DEKnull-2) foram mais estáveis e associados com a resposta de anticorpos inibitórios (BIAbs) da interação DBPII-DARC (MEDEIROS et al., 2020). Além disso, nosso grupo também mostrou que indivíduos primo-infectados tiveram um *booster* da resposta de anticorpos IgG contra DEKnull-2 após recorrência da malária por *P. vivax* com maiores níveis de anticorpos quando comparado com a variante de DBPII do surto de malária (LIMA et al., 2022), o que corrobora os nossos achados, onde os

participantes antigos (AP) apresentaram maior frequência e intensidade da resposta de IgG à DBPII e DEKnull-2 em comparação com os novos, sugerindo que o tempo de exposição influencia na aquisição da resposta de anticorpos.

De fato, os estudos mostram que um dos fatores que influenciam a resposta de anticorpos aos antígenos de *P. vivax* é o tempo de exposição ao parasito, mensurado pela idade e número prévio de casos de malária (CERÁVOLO et al., 2005; KANO et al., 2012; LANGHORNE et al., 2008; NICOLETE et al., 2016; SOUZA-SILVA et al., 2010), sendo necessária repetidas exposições ao parasito para o desenvolvimento de imunidade adquirida (MARSH e KINYANJUI, 2006; LANGHORNE et al., 2008; CROMPTON et al., 2010). Embora em nosso presente trabalho, a população do estudo seja composta por adultos pareados pela idade, o número de episódios prévios de malária foi maior nos grupos AP, o que reforça que a exposição ao parasito é um fator importante para a infecção por malária. Além disso, estes indivíduos residem em área endêmica para a malária há 19 anos, enquanto que os NP há apenas cinco anos, sendo os AP expostos ao parasito há mais tempo. Outra evidência da diferença do *status* imunológico entre os grupos AP e NP, é em relação ao diagnóstico positivo de malária. Estudos mostram que com o aumento da idade, a frequência de infecções submicroscópicas diminui (LADEIA-ANDRADE et al, 2008). No presente trabalho, a infecção malária foi detectada pela microscopia apenas em NP, enquanto que em AP foram detectados apenas por real-time PCR, sugerindo baixas parasitemias. Estudos sugerem que infecções submicroscópicas podem estar relacionadas a um bom controle da parasitemia pela imunidade efetiva aos estágios sanguíneos (MICHON et al., 2007; PHIMPRAPHI et al., 2008; MENDIS et al., 2001).

Ao avaliarmos a resposta de IgG contra DBPII e DEKnull-2 no 11º ano de acompanhamento do estudo prospectivo, em conjunto com as frequências de anticorpos obtidos nos anos 1, 6, 7 e 9 do estudo retrospectivo em antigos participantes (AP), vimos que as frequências médias da resposta de anticorpos IgG antígeno-específicos variaram contra DBPII, ao longo dos 11 anos de acompanhamento, principalmente durante o período de baixa transmissão de malária (Fase II), onde a frequência de resposta apresentou queda de 34% para

16%. Esses resultados corroboram com dados da literatura que apontam que a imunidade adquirida é perdida na ausência de exposição ao parasito (MARSH e KINYANJUI, 2006; LANGHORNE et al., 2008; CROMPTON et al., 2010), sugerindo a necessidade de uma exposição contínua para manutenção da resposta imune e que, em sua ausência, os anticorpos são de curta duração. Além disso, já foi demonstrado que os anticorpos naturalmente adquiridos contra DBPII tendem a ser de curta duração e tendenciosos para respostas específicas de cepas (CERAVOLO et al., 2009; COLE-TOBIAN et al., 2009). No contexto de declínio de transmissão, diversos outros estudos demonstraram a queda no título de anticorpos específicos para o parasito (AITKEN et al., 2010; COOK et al., 2011; DIOP et al., 2014). Alterações dos receptores de células B (BCR) e células T (TCR) levando a células disfuncionais, podem estar envolvidas no desenvolvimento de resposta imune deficiente para malária (WEISS et al., 2009; ILLINGWORTH et al., 2013; REQUENA et al., 2014; PORTUGAL et al., 2015; SULLIVAN et al., 2015). Por outro lado, a frequência da resposta de anticorpos IgG contra DEKnull-2 permaneceram estáveis mesmo durante o período de baixa transmissão de malária na região. Respostas sustentadas de IgG contra DEKnull-2 também foram descritas em indivíduos expostos à malária em longo prazo (PIRES et al., 2018; MEDEIROS et al., 2020). A resposta de anticorpos IgG contra DEKnull-2 podem ser reforçados pelo estágio sanguíneo de *P. vivax* em infecções recorrentes (LIMA et al., 2022). Esses dados corroboram a hipótese de que a resposta de anticorpos contra a DEKnull-2 é direcionada para epítomos conservados (NTUMGIA et al., 2017), diferentemente da DBPII, o que reforça o potencial da DEKnull-2 como alvo vacinal.

## **6.2 Perfil de expressão de genes relacionados com a ativação de células T e B em Respondedores de Elite**

A susceptibilidade à malária depende do perfil de exposição, características epidemiológicas e vários componentes da imunidade inata e adaptativa que influenciam na qualidade da resposta imune gerada durante a multiplicação do parasito no hospedeiro (TAKALA; PLOWE, 2009; SCHERF et al., 2008; ESCALANTE et al., 1998; DORFMAN et al., 2005; WEISS et al., 2010;

WIPASA et al., 2010; STEVENSON e RILEY, 2004; LANGHORNE et al., 2008). Mais especificamente, sabe-se que indivíduos capazes de produzir anticorpos inibidores da interação DBPII-DARC (BIAbs) de ampla reatividade às variantes, apresentam risco reduzido de malária clínica por *P. vivax* (KING et al., 2008; NICOLETI et al., 2016).

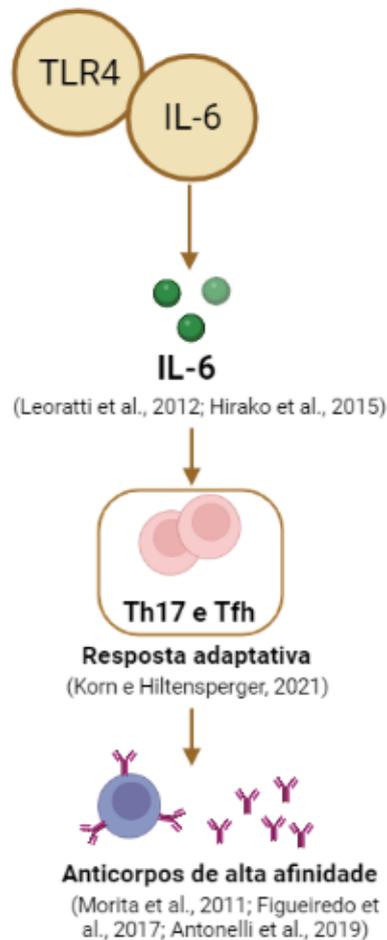
Os mecanismos que induzem a resposta imune protetora adquirida na malária são complexos e pouco compreendidos, especialmente em humanos e causada pela espécie *P. vivax* devido ao número restrito de estudos (MOORTHY, BOM e HILL, 2004; SCHLAGENHAUF, 2004; Silva e RICHTMANN, 2006). Em particular, os mecanismos que relacionam a imunidade inata e adaptativa em infecção pelo *P. vivax* constitui um grande desafio. No presente trabalho, nosso estudo longitudinal de longa duração tem permitido caracterizar indivíduos com perfis persistente de respondedores e não respondedores. Nesse sentido, para compreender os mecanismos (marcadores/vias) associados com o estabelecimento de uma resposta de anticorpos funcionais e de longa duração observados nos respondedores de elite e validar a DEKnull-2 como antígeno vacinal, avaliamos o perfil de expressão gênica de mais de 100 alvos relacionados à ativação de células T, células B e outras células do sistema imune em PBMC de respondedores de elite e não respondedores persistentes estimulados com os antígenos.

Considerando a quantidade limitada de amostras de PBMCs que tínhamos dos indivíduos incluídos no ensaio, foi feita a padronização do protocolo de extração de RNA para que fosse possível a obtenção de RNA extraído em maior quantidade e qualidade, indicado para uso no ensaio de expressão gênica pelo *Taqman Open Array*. Vários dos protocolos estabelecidos para o isolamento de RNA requerem um grande volume de amostra para se obter RNA suficiente para análise. Assim, amostras clínicas de vários pacientes são frequentemente agrupadas (MITCHELL et al., 2008; MOUSSAY et al., 2011), o que pode comprometer as análises estatísticas e levar a conclusões errôneas. No presente estudo evitamos essa limitação utilizando a concentração em *speed vacuum* das amostras extraídas. Além disso, utilizando uma etapa de PCR de pré-amplificação compatível com a

plataforma *Open Array* conseguimos solucionar o problema da pequena quantidade e qualidade variável do RNA extraído que tínhamos disponível para realização do ensaio com alvos com diferentes níveis de expressão. Aqui identificamos apenas sete genes diferencialmente expressos (DEGs) que incluem receptores relacionados à imunidade inata e citocinas pró-inflamatórias.

A resposta imune inata é caracterizada como a primeira linha de defesa contra infecção, em particular, quando as células são estimuladas por reconhecimento de patógenos e componentes relacionados aos microrganismos via receptores do tipo Toll (TLRs), desencadeando cascatas de sinalização que culminam em produção de fatores de transcrição, moléculas adaptadoras, e por fim, a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, e TNF $\alpha$  (TAKEDA et al., 2005; KAWAI e AKIRA 2010; TAKEUCHI e AKIRA 2010). Em várias doenças infecciosas, incluindo a malária, a produção de citocinas pró-inflamatórias pelo sistema imune inato em resposta à infecção, protege o organismo hospedeiro controlando o crescimento do patógeno, e favorecendo a geração de uma imunidade protetora adquirida e memória imunológica (WEISS et al. 2005; MACEDO et al. 2008; CHEN et al. 2002; SCANGA et al. 2002; CAMPOS et al. 2004; de VEER et al. 2003; MURAILLE et al. 2003; FREMOND et al. 2004; SCANGA et al. 2004). De fato, no presente estudo, o gene que codifica o TLR-4 apresentou expressão aumentada nos respondedores de elite (RE) estimulados com DEKnull-2 quando comparado com não respondedores persistentes. Além disso, o aumento da expressão gênica de TLR4 tem sido associado com o aumento de expressão do gene IL-6, responsável por codificar a citocina IL-6, uma citocina pró-inflamatória (LEORATTI et al., 2012; HIRAKO et al., 2015) que participa no desenvolvimento da imunidade adaptativa (KORN e HILTENSPERGER, 2021) induzindo a diferenciação células Th17 e Tfh (Figura 15). Estas células impulsionam as células B na geração de respostas de anticorpos de alta afinidade e longa duração (MORITA et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2017; ANTONELLI et al., 2019).

**Figura 15-** Genes TLR4 e IL-6, codificando a produção da citocina pró-inflamatória IL-6, que induz a diferenciação de células Th17 e Tfh e impulsionam as células B na geração de respostas de anticorpos de alta afinidade e longa duração.

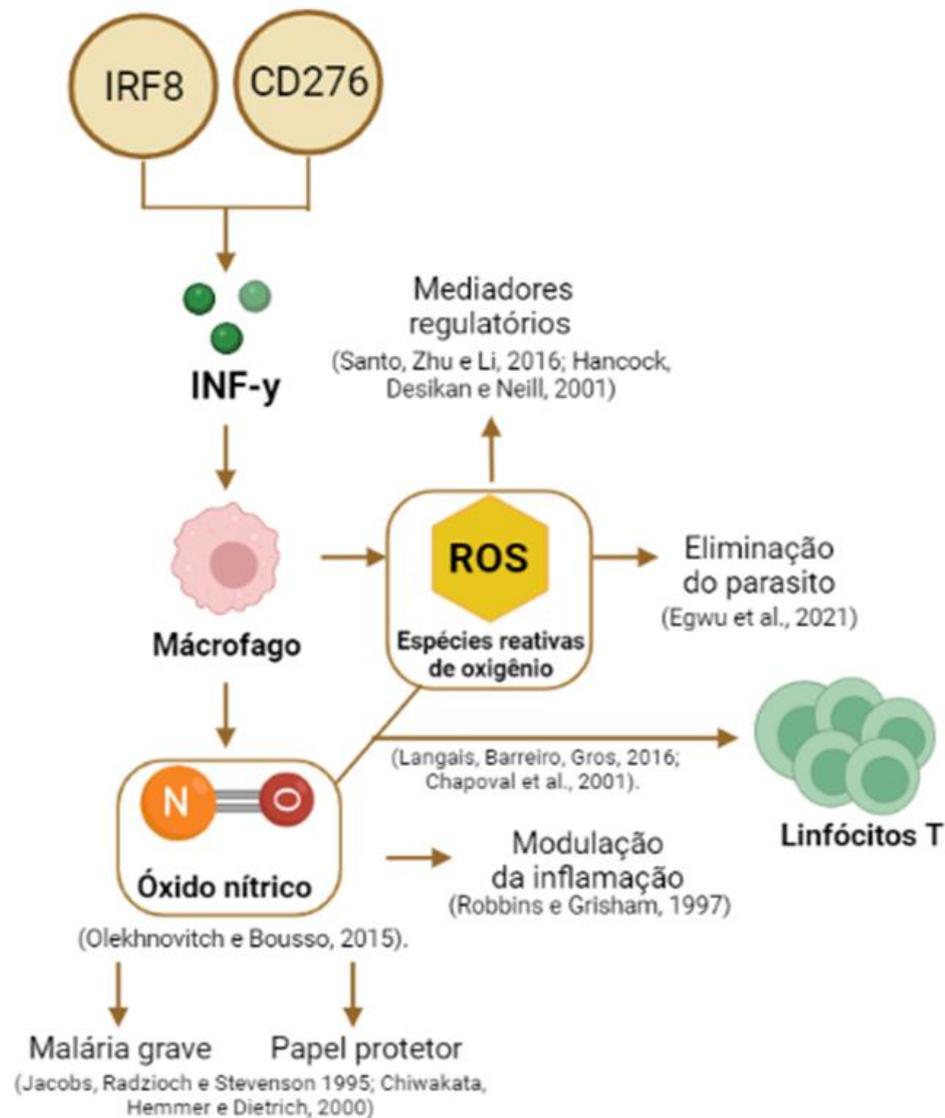


**Fonte:** criado pelo autor.

No presente trabalho, também encontramos os genes que codificam o fator regulador de interferon 8 (IRF8) e o gene CD276 que codifica a proteína da família B7, regulados positivamente. Estes genes apresentam um papel fundamental na regulação da produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), outra citocina pró-inflamatória. O IFN- $\gamma$  é responsável por mediar os mecanismos efetores dos macrófagos, aumentando sua capacidade de regular positivamente a produção de óxido nítrico (Figura 16) (OLEKHNOVITCH e BOUSSO, 2015). De fato, a via de produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos foi regulada de forma ativa em nosso estudo, envolvendo a expressão dos genes TLR4 e IRF8. O óxido nítrico modula a inflamação em vários sistemas orgânicos e condições fisiopatológicas (ROBBINS e GRISHAM, 1997). Até o momento, os relatos sobre o significado clínico do NO na malária

são conflitantes. Alguns estudos propõem que o NO contribui para o desenvolvimento de malária grave e complicada, enquanto outros argumentam que o NO possui um papel protetor contra a doença (JACOBS, RADZIOCH e STEVENSON 1995; CHIWAKATA, HEMMER e DIETRICH, 2000). Por outro lado, dados mostram que ROS geradas em baixas concentrações sob condições fisiológicas são muitas vezes benéficas, desempenhando papéis importantes como mediadores regulatórios nos processos de sinalização (SANTO, ZHU e LI, 2016; HANCOCK, DESIKAN e NEILL, 2001), sendo que a maioria dos antimaláricos convencionais elimina os parasitos via superprodução direta ou indireta de ROS (EGWU et al., 2021). Além disso, estes fatores podem atuar também no desenvolvimento de células mielóides, como macrófagos/monócitos, que controlam a parasitemia e medeiam a resistência do hospedeiro à infecção por *P. vivax* (ANTONELLI et al., 2014), e promovem a proliferação de células T (LANGAIS, BARREIRO, GROS, 2016; CHAPOVAL et al., 2001). Portanto, no presente trabalho com as informações expostas, acreditamos que a regulação positiva na expressão de TLR4, IL-6, IRF8 e CD276 observados em PBMCs dos respondedores de elite (RE) estimulados com DEKnull-2, podem favorecer o controle da parasitemia na infecção malárica e contribuir na geração da imunidade adquirida observada nestes indivíduos.

**Figura 16-** Genes IRF8 e CD276, regulando a produção de IFN- $\gamma$ , que medeia mecanismos efetores dos macrófagos, regulando positivamente a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio.

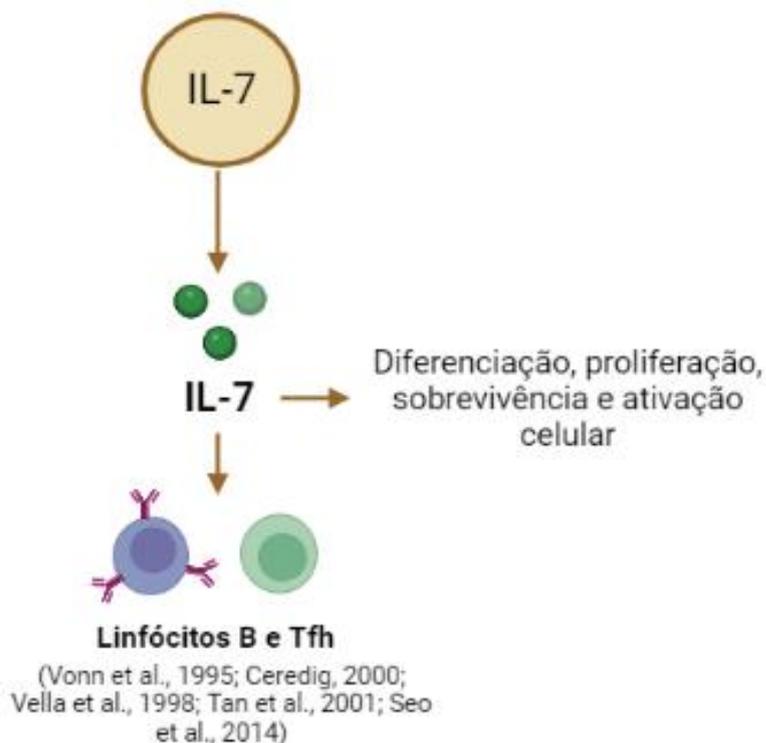


**Fonte:** criado pelo autor.

Outro importante gene que apresentou aumento de expressão em RE no presente estudo foi o IL-7, responsável pela codificação da citocina IL-7, que desempenha papéis importantes na diferenciação, proliferação, sobrevivência e ativação celular. Em particular, IL-7 é a citocina predominante associada ao desenvolvimento de linfócitos T, especialmente T auxiliar folicular e linfócitos B (Figura 17) (VONN et al., 1995; CEREDIG, 2000; VELLA et al., 1998; TAN et al., 2001; Seo et al., 2014). Um estudo de desafio do vírus herpes simplex (HSV), realizado em modelo murino demonstrou que o tratamento com IL-7 induz uma

resposta imune polarizada para o tipo Th2, aumentando a produção de anticorpos neutralizantes e ainda, aumento da atividade de linfócitos T citotóxicos antígeno-específicos (CTL) (SIN et al., 2000). Além disso, a IL-7 utilizada como adjuvante molecular em vacinas, promoveu significativamente a produção de anticorpos neutralizantes e ativação de células B no centro germinativo (SEO et al., 2014; CHEN et al., 2019), sugerindo que a IL-7 pode auxiliar células B maduras na diferenciação de células B de memória e plasmócitos. Esta função pode ser indiretamente regulada por IL-7 através de células T foliculares auxiliares (Tfh), que ativam as células B para diferenciação e produção de anticorpos neutralizantes de patógenos e a formar células B de memória em infecções por Influenza e SARS-CoV-2 (MCDONALD et al., 2016; SHAAN et al., 2021).

**Figura 17-** Gene IL-7 codificando a produção de IL-7, principal citocina associada ao desenvolvimento de linfócitos T auxiliar folicular e linfócitos B.

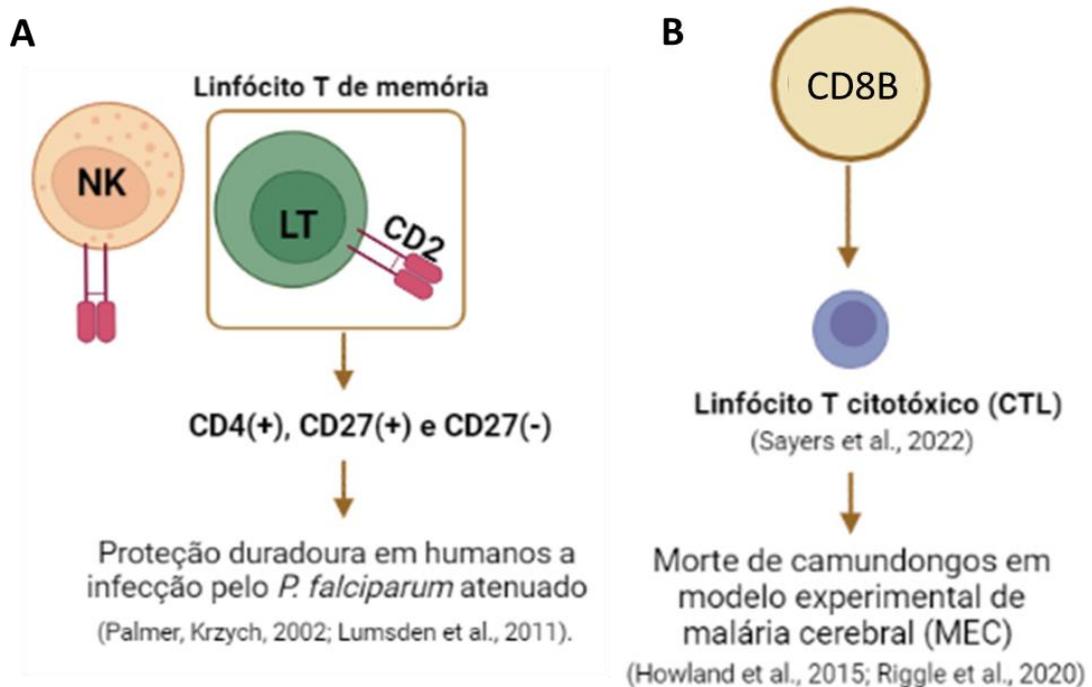


**Fonte:** criado pelo autor.

Dessa forma, as observações expostas acima sugerem que os respondedores de elite (RE) parecem ter uma regulação positiva de genes relacionados com o desenvolvimento de uma resposta imune protetora e de

longa duração. No entanto, o CD2 foi um DEG regulado negativamente em respondedores de elite estimulados com DEKnull-2 encontrado em nosso trabalho. Essa molécula de adesão é encontrada em células natural killer e linfócito T (NERNEY E KUMAR, 2006; ITANO, 1989) especificamente, sua expressão é regulada positivamente nos linfócitos T de memória, onde desempenha um papel importante na ativação dessas células (CRISTÃ et al 2020). Na malária, a expansão de subpopulações de linfócitos T de memória CD4(+), CD27(+) e CD27(-) tem sido associada à proteção duradoura em humanos expostos a múltiplas picadas de mosquitos *Anopheles* infectados com *Plasmodium falciparum* atenuado (Figura 18A) (PALMER, KRZYCH, 2002; LUMSDEN et al., 2011). Já o gene CD8B apresentou regulação negativa sob ambos os estímulos (DBPII e DEKnull-2). Este gene é responsável por iniciar diferentes vias de sinalização intracelular levando à ativação de linfócitos T citotóxicos (CTLs) (Figura 18B) (SAYERS et al., 2022), sendo que os CTLs tem sido associados como o principal mediador da morte de camundongos em modelo experimental de malária cerebral (MEC) (Figura 18B) (HOWLAND et al., 2015; RIGGLE et al., 2020). Neste caso, uma possível explicação é que sob estímulos com antígenos de *P. vivax* há uma imunoregulação em células mononucleares obtidas dos respondedores de elite, já que estes indivíduos estão sob longa exposição à malária e, assim, sendo capazes de modular a resposta imune inflamatória, como observados em indivíduos assintomáticos (FRIMPONG et al., 2020).

**Figura 18- Genes down-regulated em Respondedores de Elite. A.** Gene CD2 que participa na expansão de subpopulações de linfócitos T de memória CD4(+), CD27(+) e CD27(-). **B.** Gene CD8B responsável pela ativação de linfócitos T citotóxicos (CTLs)



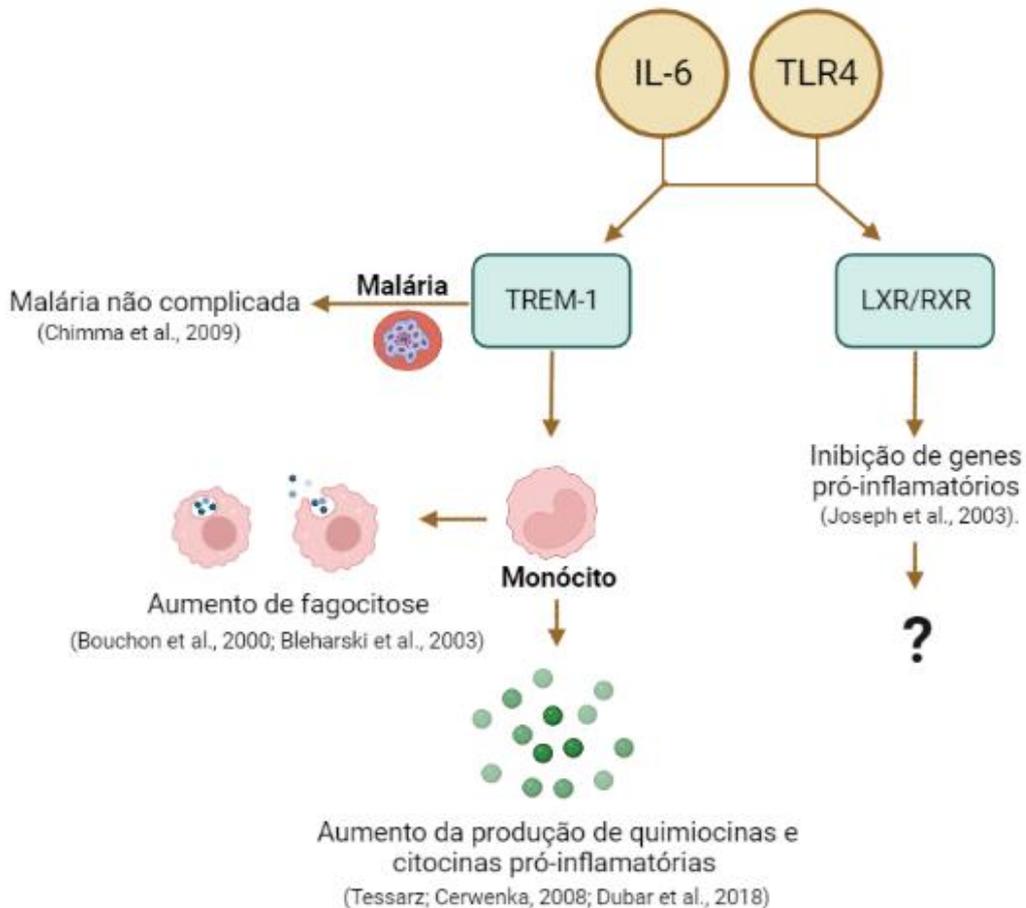
**Fonte:** criado pelo autor.

Em seguida, a fim de identificar vias relacionadas com a resposta imune humoral de longa duração em respondedores de elite, realizamos a análise de enriquecimento funcional dos genes diferencialmente expressos. As vias canônicas encontradas significativamente enriquecidas foram encontradas apenas sob o estímulo com DEKnull-2, havendo participação dos genes TLR4 e IL-6 nas vias de sinalização TREM-1 (do inglês, *triggering receptor expressed on myeloid cells 1*) e ativação de receptor X hepático LXR/RXR. A sinalização intracelular induzida por meio do receptor TREM-1, resulta em diferentes respostas celulares envolvidas no processo da inflamação, promovendo o aumento da fagocitose, produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (IL-8, TNF $\alpha$  e GM-CSF) por ativação em monócitos (Figura19) (BOUCHON et al., 2000; BLEHARSKI et al., 2003; TESSARZ; CERWENKA, 2008; DUBAR et al., 2018). No contexto da malária, estudos documentando a associação entre TREM-1 e a infecção são escassos. Chimmia e colaboradores (2009) relataram que o nível de TREM-1 está associado a casos de malária não complicada. No

entanto, o mecanismo exato do envolvimento de TREM-1 na resposta às doenças não está claro.

Outra via canônica significativamente encontrada associada aos respondedores de elite foi a ativação de LXR/RXR. Esta via está associada à regulação da expressão gênica por ligação preferencial aos elementos de resposta do LXR (SONG et al., 1994). Os LXRs reprimem reciprocamente um conjunto de genes pro-inflamatórios após estimulação bacteriana, como o LPS, TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$  (JOSEPH et al., 2003). A inibição da sinalização inflamatória por LXR foi demonstrada em diversos estudos de lesões vasculares *in vivo* (JOSEPH et al., 2003; FOWLER et al., 2003; TERASAKA et al., 2005). No entanto, o mecanismo subsequente à repressão de genes inflamatórios por LXRs é pouco compreendido, principalmente na infecção malárica.

**Figura 19-** Genes TLR4 e IL-6 atuando na ativação das vias de sinalização TREM-1 e ativação de receptor X hepático LXR/RXR.

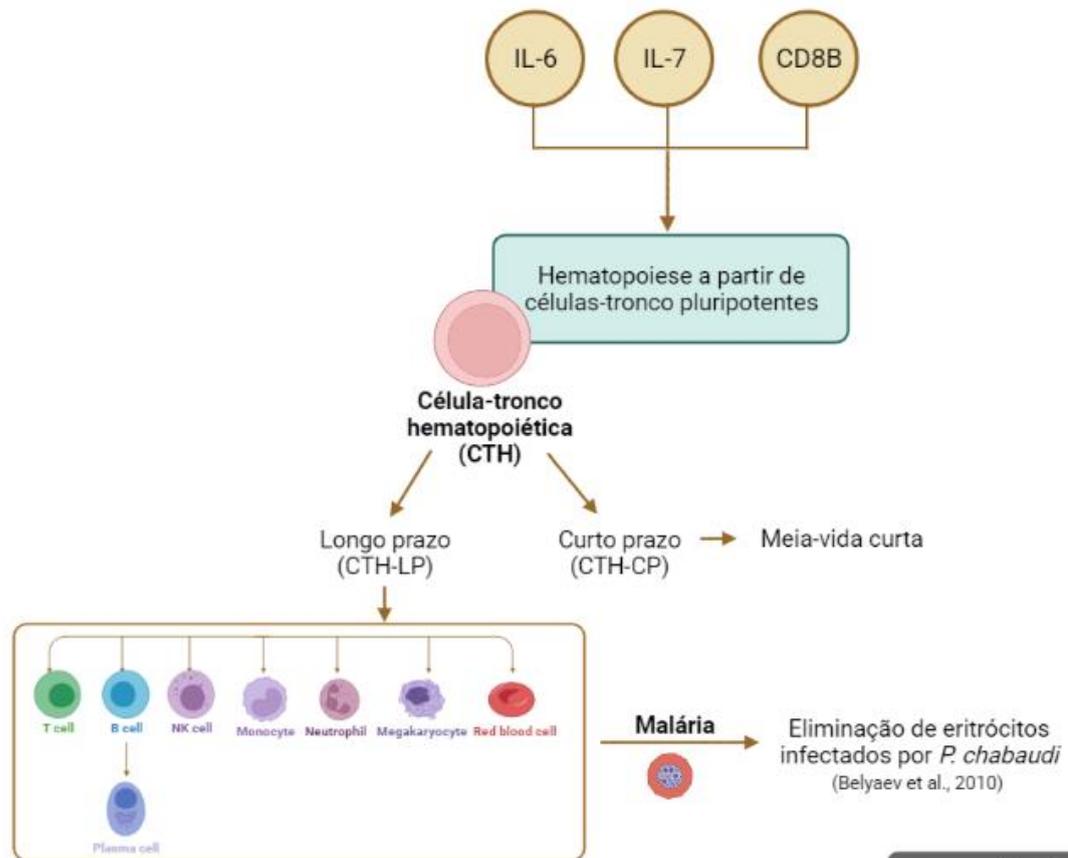


**Fonte:** criado pelo autor.

Além das vias TREM-1 e ativação de LXR/RXR, vimos que os genes TLR4 e IL-6 juntamente com IRF8 e CD8B participam das vias de maturação de células dendríticas e comunicação de células relacionadas à resposta imune inata e resposta adaptativa, respectivamente. As células dendríticas (DCs) iniciam as respostas imunes inata e adaptativa (WYKES e BOM, 2008), sendo consideradas as células apresentadoras de antígenos mais potentes, governando tanto a imunidade quanto a tolerância das células T (WAISMAN et al., 2017). As DCs apresentam um papel vital no início e na regulação da imunidade adaptativa à malária no estágio sanguíneo (ELLIOTT, KUNS, e GOOD, 2005; WYKES e GOOD, 2007). Seixas e colaboradores (2001) demonstraram que eritrócitos infectados por *P. chabaudi* ativam diretamente células dendríticas *in vitro* (SEIXAS et al., 2001); além disso, células dendríticas funcionais foram induzidas *in vivo* pela infecção por *P. yoelii* (PERRY et al., 2004), podendo iniciar respostas imunes protetoras contra a doença (ROMERO e RODRIGUEZ, 2001).

No presente trabalho, os DEGs IL6 juntamente com IL7 e CD8B foram associados com a via da hematopoiese a partir de células-tronco pluripotentes (Figura 20). As células-tronco hematopoéticas (CTH) são células que possuem a capacidade de se autorrenovar e se diferenciar em células especializadas do tecido sanguíneo e células do sistema imune (JUNIOR, ODONGO e DULLEY, 2009). Alguns estudos têm revelado a possibilidade de existirem dois tipos de CTH: células-tronco hematopoéticas de longo prazo (CTH-LP) e células-tronco hematopoéticas de curto prazo (CTH-CP) (MORRISON e WEISSMAN, 1994). As CTH-LP proliferam-se ao longo da vida do organismo, podendo se autorrenovar em longo prazo e regenerar todos os tipos de células sanguíneas. As CTH-LP diferenciam-se das CTH-CP, cuja capacidade de se autorrenovar é limitada, levando-as a ter uma meia-vida de somente poucos meses. A extensa caracterização imunofenotípica de células-tronco hematopoéticas e células progenitoras permitiu a identificação de uma população anômala de progenitores mielolinfóides que contribuíram para a eliminação de eritrócitos infectados durante a infecção por *P. chabaudi* (BELYAEV et al., 2010). No entanto, ainda pouco se sabe sobre a dinâmica das CTH mais primitivas em resposta à infecção por *Plasmodium*.

**Figura 20-** Genes IL-6, IL-7 e CD8B participando da ativação da via da hematopoiese a partir de células-tronco pluripotentes de longo prazo.

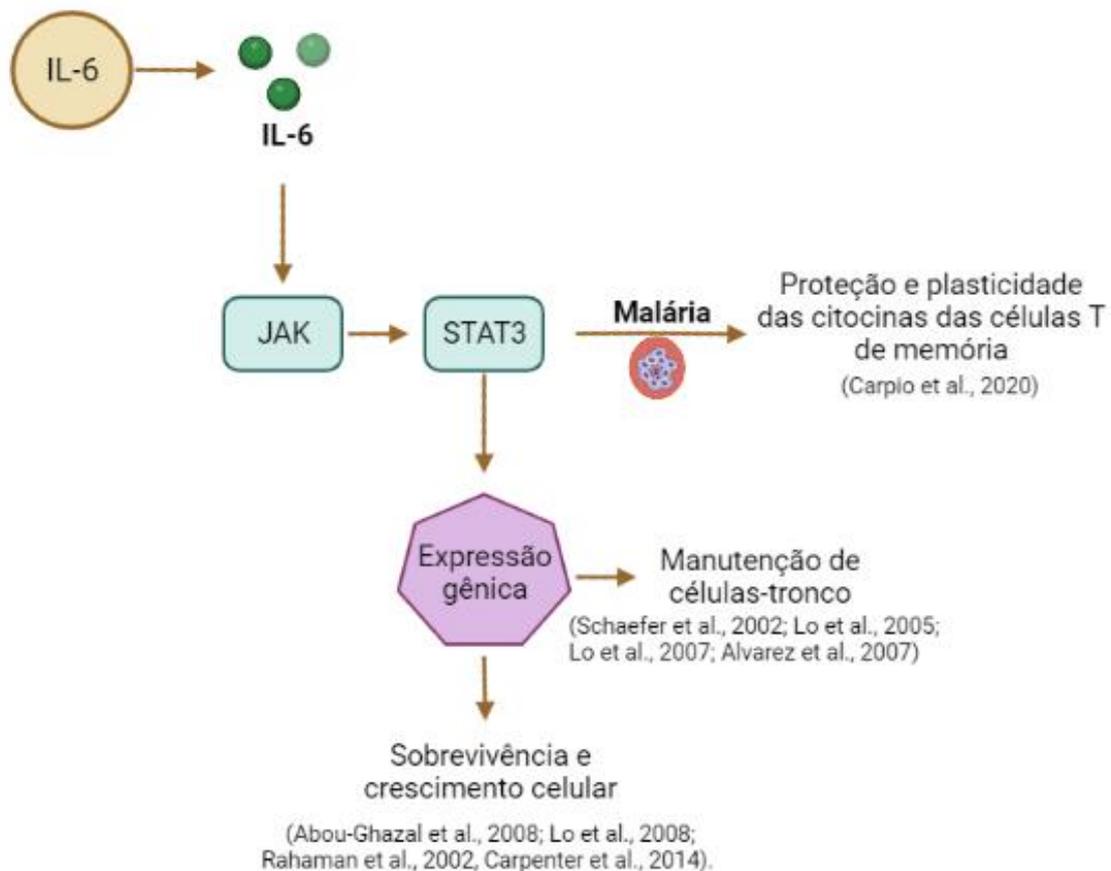


Fonte: criado pelo autor.

A via JAK/STAT é ativada pela sinalização de diversas citocinas para orquestrar a hematopoiese, induzir inflamação e controlar a resposta imune (MORRIS et al., 2018). Além disso, a sinalização JAK/STAT também é responsável por mediar respostas imunes via diferenciação de células B e T (BANERJEE et al., 2017; O'SHEA e PLENGE, 2013). Essa sinalização intracelular é propagada por membros da família das quinases Janus (JAK) que sofre trans e auto-fosforilação (LIU, GAFFEN e GOLDSMITH, 1998), levando a ativação e a fosforilação do fator de transcrição STAT, particularmente STAT3 no caso da sinalização por IL-6 (Figura 21) (YANG et al., 2005). Esta modificação permite que STAT3 sofra translocação para o núcleo onde reconhece regiões de genes alvo, para iniciação da transcrição destes fatores (MERTENS et al., 2007). STAT3 regula uma diversidade de processos celulares, promovendo a transcrição de genes relacionados à sobrevivência e crescimento celular, angiogênese, bem como genes pró-apoptóticos. Também

induz a expressão do supressor de sinalização de citocinas (SOCS), reguladores negativos que previnem ativação prolongada de STAT3 em organismos saudáveis. Além disso, STAT3 é necessário para a manutenção de células-tronco (SCHAEFER et al., 2002; LO et al., 2005; LO et al., 2007; ALVAREZ et al., 2007; ABOU-GHAZAL et al., 2008; LO et al., 2008; RAHAMAN et al., 2002, CARPENTER et al., 2014). Na malária, o STAT3 se mostrou um fator-chave que regula a proteção e a plasticidade das citocinas das células T de memória na infecção (CARPIO et al., 2020).

**Figura 21-** Ativação da via JAK/STAT3 a partir do aumento da expressão do gene IL-6, responsável pela codificação da citocina IL-6.



**Fonte:** criado pelo autor.

De forma geral, os dados encontrados na literatura relacionados às vias encontradas no nosso estudo, indicam que respondedores de elite parecem ativar vias relacionadas com o desenvolvimento de uma resposta imune inata e adaptativa, dos quais participam genes envolvidos na interação de células T e

B. Embora neste estudo, apenas sete DEGs foram encontrados, eles podem explicar o perfil de uma resposta imune humoral de longa duração e protetora nos respondedores de elite para DEKnull-2 e assim, contribuir na geração de conhecimento do estabelecimento da resposta imune de longa duração. Além disso, nossos resultados mostram que o enriquecimento funcional dos DEGs encontrou vias relacionadas apenas de células de respondedores estimuladas com o antígeno sintético baseado na DBPII, reforçando o potencial da DEKnull-2 como antígeno vacinal.

## 7. CONCLUSÃO

- A DEKnull-2 induz uma resposta de anticorpos de maior estabilidade que a DBPII Sal-1 (cepa-referência), reforçando seu potencial como candidato vacinal;
- O estímulo de PBMCs de Respondedores de elite com DEKnull-2 regula a expressão de genes relacionados com o estabelecimento da resposta imune inata e adaptativa de longa duração.
- A comunicação entre a resposta imune inata e adquirida são importantes para o estabelecimento da imunidade de longa duração nos respondedores de elite.

## 8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. H., et al. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 15, p. 7085-9, Aug 01 1992.
- ADDAI-MENSAH, O., et al. Acquired immune responses to three malaria vaccine candidates and their relationship to invasion inhibition in two populations naturally exposed to malaria. **Malaria journal**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2016.
- ADUKPO, S., et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) and cytokine gene variants in complicated and uncomplicated malaria. **Tropical Medicine & International Health**, v. 21, n. 12, p. 1592-1601, 2016.
- AITKEN, E. H., et al. Antibodies to chondroitin sulfate A-binding infected erythrocytes: dynamics and protection during pregnancy in women receiving intermittent preventive treatment. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, n. 9, p. 1316–25, 2010.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature reviews immunology**, v. 4, n. 7, p. 499-511, 2004.
- ALEXANDRE, M. A. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 10, p. 1611, 2010.
- ALMEIDA, E. D., VIEIRA J. L. F. Factors associated with non-adherence to the treatment of vivax malaria in a rural community from the Brazilian Amazon Basin. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 248-251, 2016.
- ANTONELLI, L. R., et al. The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. **Immunological Reviews**, v. 29, p. 1-27, 2020.
- ANTONELLI L. R. V. et al. The CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Inflammatory Monocyte Subset Displays Increased Mitochondrial Activity and Effector Function During Acute *Plasmodium vivax* Malaria. **PLoS Pathog** 10(9): e1004393, 2014.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN- $\gamma$  from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 6, p. 2956-2963, 2002.
- BAIRD, J. K., et al. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. **The American journal**

**of tropical medicine and hygiene**, v. 45, n. 1, p. 65-76, 1991.

BAIRD, J. K. Evidence and implications of mortality associated with acute Plasmodium vivax malaria. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 1, p. 36-57, 2013.

BANCHEREAU, J. et al., Immunobiology of dendritic cells. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 767-811, 2000.

BANERJEE, S. et al., JAK–STAT signaling as a target for inflammatory and autoimmune diseases: current and future prospects. **Drugs**, v. 77, n. 5, p. 521-546, 2017.

BARBEDO, M. B. et al., Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of Plasmodium vivax. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 335- 340, 2007.

BARNETT, B. E. et al., Cutting edge: B cell–intrinsic T-bet expression is required to control chronic viral infection. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 4, p. 1017-1022, 2016

BARNWELL, J. W. et al., Plasmodium vivax merozoite antigens, the Duffy blood group, and erythrocyte invasion. In: **Malaria and the red cell: 2. Proceedings of the second workshop on malaria and the red cell, held in Ann Arbor, Michigan, USA, October 24, 1988. Alan R. Liss, Inc., 1989.** p. 1-11.

BEESON, J. G.; CRABB, B. S. Towards a vaccine against Plasmodium vivax malaria. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 12, p. e350, 2007.

BELYAEV, N. N. et al., Induction of an IL7-R+ c-Kithi myelolymphoid progenitor critically dependent on IFN- $\gamma$  signaling during acute malaria. **Nature immunology**, v. 11, n. 6, p. 477-485, 2010.

BINDER, C. et al., CD2 immunobiology. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1090, 2020.

BLEHARSKI, J. R. et al., A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 7, p. 3812-3818, 2003.

BOSCO, N.; AGENÈS, F.; CEREDIG, R. Effects of increasing IL-7 availability on lymphocytes during and after lymphopenia-induced proliferation. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 1, p. 162-170, 2005.

BOUCHON, Axel; DIETRICH, Jes; COLONNA, Marco. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 10, p. 4991-4995, 2000

BOYLE, M. J. et al. Human antibodies fix complement to inhibit Plasmodium falciparum invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 580-90, Mar 17 2015.

BRAGA, E. M.; FONTES, C. J.; KRETTLI, A. U. Persistence of humoral response against sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to Plasmodium vivax. **J Infect Dis**, v. 177, n. 4, p. 1132-5, Apr 1998.

BRIGL, M.; BRENNER, M. B. CD1: antigen presentation and T cell function. **Annual review of immunology**, v. 22, p. 817, 2004.

BRITO, M. A. M. et al., Morphological and transcriptional changes in human bone marrow during natural Plasmodium vivax malaria infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 225, n. 7, p. 1274-1283, 2022.

BRUÑA-ROMERO, O.; RODRIGUEZ, A. Dendritic cells can initiate protective immune responses against malaria. **Infection and immunity**, v. 69, n. 8, p. 5173-5176, 2001.

CARPIO, V. H. et al., T helper plasticity is orchestrated by STAT3, Bcl6, and Blimp-1 balancing pathology and protection in malaria. **IScience**, v. 23, n. 7, p. 101310, 2020.

CERAVOLO, I. P. et al., Inhibitory properties of the antibody response to Plasmodium vivax Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. **Scand J Immunol**, v. 67, n. 3, p. 270-8, Mar 2008.

CERAVOLO, I. P. et al., Naturally acquired inhibitory antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. **Clin Exp Immunol**, v. 156, n. 3, p. 502-10, Jun 2009.

CHAN, J. A.; FOWKES, F. J.; BEESON, J. G. Surface antigens of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 19, p. 3633-57, Oct 2014.

CHEN, C. et al., A recombinant canine distemper virus expressing interleukin-7 enhances humoral immunity. **Journal of General Virology**, v. 100, n. 4, p. 602-615, 2019.

CHIMMA, P. et al., A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000631, 2009.

CHIM-ONG, A. et al. The blood stage antigen RBP2-P1 of Plasmodium vivax binds reticulocytes and is a target of naturally acquired immunity. **Infection and immunity**, v. 88, n. 4, p. e00616-19, 2020.

CHITNIS, C. E.; MILLER, L. H. Identification of the erythrocyte binding domains of Plasmodium vivax and Plasmodium knowlesi proteins involved in erythrocyte

invasion. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 2, p. 497-506, 1994.

CHIWAKATA, C. B.; HEMMER, C. J.; DIETRICH, M. High levels of inducible nitric oxide synthase mRNA are associated with increased monocyte counts in blood and have a beneficial role in *Plasmodium falciparum* malaria. **Infection and immunity**, v. 68, n. 1, p. 394-399, 2000.

CHOOTONG, P. et al., Characterization of inhibitory anti-Duffy binding protein II immunity: approach to *Plasmodium vivax* vaccine development in Thailand. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35769, 2012.

COBAN, C. et al. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 1, p. 19-25, 2005.

COBAN, C. et al. Pathological role of Toll-like receptor signaling in cerebral malaria. **International immunology**, v. 19, n. 1, p. 67-79, 2007.

COHEN, S.; BUTCHER, G. A.; CRANDALL, R. B. Action of malarial antibody in vitro. **Nature**, v. 223, n. 5204, p. 368-71, Jul 26 1969.

COHEN, S.; MC, G. I.; CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**, v. 192, p. 733-7, Nov 25 1961.

COLE-TOBIAN, J. L. et al. Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous *plasmodium vivax* strains in Papua New Guinean children. **Infect Immun**, v. 77, n. 9, p. 4009-17, Sep 2009.

COLE-TOBIAN, J.; KING, C. L. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 127, n. 2, p. 121-132, 2003.

COOK, J.; K., I.; et al. Serological markers suggest heterogeneity of effectiveness of malaria control interventions on Bioko Island, Equatorial Guinea. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1-9, 2011.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755-766, 2006.

CROMPTON, P. D. et al. Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. **Annual review of immunology**, v. 32, p. 157-187, 2014.

DE CASTRO, M. C. et al. Malaria risk on the Amazon frontier. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 7, p. 2452-2457, 2006.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.

DIOP, F. Dramatic declines in seropositivity as determined with crude extracts of *Plasmodium falciparum* schizonts between 2000 and 2010 in Dielmo and Ndiop, Senegal. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2014.

DOOLAN, D. L.; HOFFMAN, S. L. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. **The Journal of Immunology**, v. 163, n. 2, p. 884-892, 1999.

DÖRNER, T.; RADBRUCH, A. Selecting B cells and plasma cells to memory. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 4, p. 497, 2005.

DUBAR, M. et al. Effects of *Porphyromonas gingivalis* LPS and LR12 peptide on TREM-1 expression by monocytes. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, n. 7, p. 799–805, 2018.

EGWU, C. O. et al. Superoxide: A major role in the mechanism of action of essential antimalarial drugs. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 167, p. 271-275, 2021

ELLIOTT, S. R.; KUNS, R. D.; GOOD, M. F. Heterologous immunity in the absence of variant-specific antibodies after exposure to subpatent infection with blood-stage malaria. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 2478-2485, 2005.

ERDMAN, L. K. et al. Combinations of host biomarkers predict mortality among Ugandan children with severe malaria: a retrospective case-control study. **PLoS one**, v. 6, n. 2, p. e17440, 2011.

FANG, X. et al. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 44, n. 1, p. 125-132, 1991.

FARIA, G. ; LUZ, G.S ; BETIN, T.A . Aspecto Epidemiológico Das Notificações De Malária Entre 2012 A 2017 No Município Rondolândia-Mt. **Revista De Atenção À Saúde**, v. 17, p. 83-90, 2019.

FERLAZZO, G. et al. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 3, p. 343-351, 2002.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. FISHER, Rosie A. et al. The response of an Eastern Amazonian rain forest to drought stress: results and modelling analyses from a throughfall exclusion experiment. **Global Change Biology**, v. 13, n. 11, p. 2361-2378, 2007.

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

FOWLER, A. J. et al. Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity

in irritant and allergic contact dermatitis models: liver-X-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 2, p. 246-255, 2003.

FRANKLIN, B. S. et al. Malaria primes the innate immune response due to interferon-  $\gamma$  induced enhancement of toll-like receptor expression and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 14, p. 5789-5794, 2009.

FRASER, T. et al. Expression and serologic activity of a soluble recombinant Plasmodium vivax Duffy binding protein. **Infection and immunity**, v. 65, n. 7, p. 2772- 2777, 1997.

FRIMPONG, A. et al. Asymptomatic malaria infection is maintained by a balanced pro-and anti-inflammatory response. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 559255, 2020.

GAZZINELLI, R. T.; ROPERT, C.; CAMPOS, M. A. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. **Immunological reviews**, v. 201, n. 1, p. 9-25, 2004.

GEROSA, F. et al. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 2, p. 727-734, 2005.

GILMORE, T. D. Introduction to NF- $\kappa$ B: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6680-6684, 2006.

GOLGHER, D.; GAZZINELLI, R. T. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. **Autoimmunity**, v. 37, n. 5, p. 399-409, 2004.

GOOD, M. F. et al. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. **Annual review of immunology**, v. 23, p. 69, 2005.

GOSI, P. et al. Polymorphism patterns in Duffy-binding protein among Thai Plasmodium vivax isolates. **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2008.

GRIMBERG, B. T. Methodology and application of flow cytometry for investigation of human malaria parasites. **Journal of immunological methods**, v. 367, n. 1-2, p. 1-16, 2011.

GRUSZCZYK, J. et al. Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for *Plasmodium vivax*. **Science**, v. 359, n. 6371, p. 48-55, 2018.

HIETANEN, J. et al. Naturally induced humoral response against Plasmodium vivax reticulocyte binding protein 2P1. *Malaria Journal*, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2021.

HILL, D. L. et al. Opsonising antibodies to *P. falciparum* merozoites associated

with immunity to clinical malaria. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74627, 2013.

HIRAKO, I. C. et al. DNA-containing immunocomplexes promote inflammasome assembly and release of pyrogenic cytokines by CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD64<sup>high</sup> CD32<sup>low</sup> inflammatory monocytes from malaria patients. **MBio**, v. 6, n. 6, p. e01605-15, 2015.

HOLZ, L. E.; FERNANDEZ-RUIZ, D.; HEATH, W. R. Protective immunity to liverstage malaria. **Clin Transl Immunology**, v. 5, n. 10, p. e105, Oct 2016.

HONDOWICZ, B.; SCOTT, P. Influence of host and parasite factors on the innate immune response and Th2 stability following infection with *Leishmania major*. **Microbes and infection**, v. 1, n. 1, p. 65-71, 1999.

HOPP, C. S. et al. Atypical B cells up-regulate costimulatory molecules during malaria and secrete antibodies with T follicular helper cell support. **Science Immunology**, v. 7, n. 71, p. eabn1250, 2022.

IDAGHDOUR, Y. et al. Evidence for additive and interaction effects of host genotype and infection in malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 42, p. 16786-16793, 2012.

ING, R. et al. Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 1, p. 441-450, 2006.

IOANNIDIS, L. J. et al. CyTOF mass cytometry analysis of human memory CD4<sup>+</sup> T cells and memory B cells. **STAR protocols**, v. 3, n. 2, p. 101269, 2022.

ITANO, E. N. Receptor de membrana de Linfócito T humano para eritrocitos de carneiro (CD2). **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 10, n. 2, p. 119-123, 1989.

JOSEPH, S. B. et al. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. **Nature medicine**, v. 9, n. 2, p. 213-219, 2003.

KANO, F. S. et al. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. **Tropical Medicine & International Health**, v. 17, n. 8, p. 989-1000, 2012.

KANO, F. S. et al. Susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria associated with DARC (Duffy antigen) polymorphisms is influenced by the time of exposure to malaria. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2018.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-650, 2011.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. **Arthritis**

**research & therapy**, v. 8, n. 2, p. 1-6, 2006.

KNOX, J. J.; KAPLAN, D. E.; BETTS, M. R. T-bet-expressing B cells during HIV and HCV infections. **Cellular immunology**, v. 321, p. 26-34, 2017.

KOCHAYOO, P. et al. The acquisition of long-lived memory B cell responses to merozoite surface protein-8 in individuals with *Plasmodium vivax* infection. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2019.

KOCHAYOO, P. et al. The persistence of naturally acquired antibodies and memory B cells specific to rhoptry proteins of *Plasmodium vivax* in patients from areas of low malaria transmission. **Malaria journal**, v. 18, n. 1, p. 1-13, 2019.

KRISHNEGOWDA, G. et al. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8606-8616, 2005.

LADEIA-ANDRADE, S. et al. Monitoring the efficacy of chloroquine-primaquine therapy for uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria in the main transmission hot spot of Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 5, p. e01965-18, 2019.

LANGHORNE, J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nat Immunol**, v. 9, n. 7, p. 725-32, Jul 2008.

LANGLAIS, D.; BARREIRO, L. B.; GROS, P. The macrophage IRF8/IRF1 regulome is required for protection against infections and is associated with chronic inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 4, p. 585-603, 2016.

LEHNER, T. et al. The emerging role of innate immunity in protection against HIV-1 infection. **Vaccine**, v. 26, n. 24, p. 2997-3001, 2008.

LEORATTI, F. M. S. et al. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 6, p. e1710, 2012.

LIM, K. J. et al. Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can be remembered for more than 30 years in persons exposed to *Plasmodium vivax*. **Parasitol Res**, v. 92, n. 5, p. 384-9, Mar 2004.

LIMA, B. A. S et al. Antibody response to a new member of the DBL family (EBP2) after a brief *Plasmodium vivax* exposure. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 16, n. 6, p. e0010493, 2022.

LIMA-JUNIOR, J. C. et al. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals. **Vaccine**, v. 26, n. 51, p. 6645-6654, 2008.

LUMSDEN, J. M. et al. Protective immunity induced with the RTS, S/AS vaccine is associated with IL-2 and TNF- $\alpha$  producing effector and central memory CD4+ T cells. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e20775, 2011.

MALLERET, B. et al. *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 125, n. 8, p. 1314-1324, 2015.

MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite immunology**, v. 28, n. 1-2, p. 51-60, 2006.

MAYOR, A.; ALANO, P. Bone marrow reticulocytes: a *Plasmodium vivax* affair?. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 125, n. 8, p. 1203-1205, 2015.

MCDONALD, P. W. et al. IL-7 signalling represses Bcl-6 and the TFH gene program. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2016.

MCGREGOR, I. A. Mechanisms of acquired immunity and epidemiological patterns of antibody responses in malaria in man. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 50, n. 3-4, p. 259, 1974.

MEDEIROS, C. M. P. et al. Dynamics of IgM and IgG responses to the next generation of engineered Duffy binding protein II immunogen: Strain-specific and strain- transcending immune responses over a nine-year period. **PloS one**, v. 15, n. 5, p. e0232786, 2020.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819-826, 2007.

MENDIS, K. et al. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 64, n. 1\_suppl, p. 97-106, 2001.

MICHON, P. A. et al. Serologic responses to recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in a Colombian village. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 59, n. 4, p. 597-599, 1998.

MICHON, P. et al. The risk of malarial infections and disease in Papua New Guinean children. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 76, n. 6, p. 997, 2007.

MIGOT, F. et al. Anti-malaria antibody-producing B cell frequencies in adults after a *Plasmodium falciparum* outbreak in Madagascar. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 102, n. 3, p. 529-534, 1995.

MILLER, L. H. et al. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy blood-group genotype, FyFy. **N Engl J Med**, v. 295, n. 6, p. 302-4, Aug 05 1976.

MITCHELL, P. S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 30, p. 10513-10518, 2008.

MORITA, R. et al. Human blood CXCR5+ CD4+ T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. **Immunity**, v. 34, n. 1, p. 108-121, 2011.

MORRIS, R.; KERSHAW, N. J.; BABON, J. J. The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. **Protein Science**, v. 27, n. 12, p. 1984-2009, 2018.

MORRISON, S. J.; WEISSMAN, I. L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. **Immunity**, v. 1, n. 8, p. 661-673, 1994.

MOUSSAY, E. et al. MicroRNA as biomarkers and regulators in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 16, p. 6573-6578, 2011.

NDUNGU, F. M. et al. Long-lived *Plasmodium falciparum* specific memory B cells in naturally exposed S wedish travelers. **European journal of immunology**, v. 43, n. 11, p. 2919-2929, 2013.

NDUNGU, F. M. et al. Memory B cells are a more reliable archive for historical antimalarial responses than plasma antibodies in no-longer exposed children. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 21, p. 8247- 8252, 2012.

NGANOU-MAKAMDOP, K. et al. Long term protection after immunization with *P. berghei* sporozoites correlates with sustained IFN $\gamma$  responses of hepatic CD8+ memory T cells. **PLoS one**, v. 7, n. 5, p. e36508, 2012.

NICOLETE, V. C. et al. Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein and Clinical Immunity to Malaria in Rural Amazonians. **J Infect Dis**, v. 214, n. 10, p. 1539-1546, Nov 15 2016.

NJAU, M. N.; JACOB, J. The enigma of memory B cells in malaria. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 12, p. 3146-3149, 2012.

NÓBREGA DE SOUSA, T.; CARVALHO, L. H.; ALVES DE BRITO, C. F. Worldwide genetic variability of the Duffy binding protein: insights into *Plasmodium vivax* vaccine development. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e22944, 2011.

NTUMNGIA, F. B. et al. An engineered vaccine of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein enhances induction of broadly neutralizing antibodies. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

O'DONNELL, R. A. et al. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. **J Exp Med**, v. 193, n. 12, p. 1403-12, Jun 18 2001.

OJO-AMAIZE, E. A. et al. *Plasmodium berghei* sporozoites are mitogenic for murine T cells, induce interferon, and activate natural killer cells. **The Journal of Immunology**, v. 133, n. 2, p. 1005-1009, 1984.

O'SHEA, J. J.; PLENGE, R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. **Immunity**, v. 36, n. 4, p. 542-550, 2012.

PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6853-6866, 1999.

PAHO. **Report on the Situation of Malaria in the Americas 2014**. Washington, D.C: Pan American Health Organization 2016.

PALM, N. W.; MEDZHITOV, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. **Immunological reviews**, v. 227, n. 1, p. 221-233, 2009.

PALM, N. W.; MEDZHITOV, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. **Immunological reviews**, v. 227, n. 1, p. 221-233, 2009.

PALMER, D. R.; KRZYCH, U. Cellular and molecular requirements for the recall of IL-4-producing memory CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>T cells during protection induced by attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. **European journal of immunology**, v. 32, n. 3, p. 652-661, 2002.

PARROCHE, P. et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 6, p. 1919-1924, 2007.

PATARROYO, M. E.; BERMUDEZ, A.; MORENO-VRANICH, A. Towards the development of a fully protective *Plasmodium falciparum* antimalarial vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1057-1070, 2012.

PAYNE, R. O. et al. *Plasmodium vivax* controlled human malaria infection—Progress and Prospects. **Trends in parasitology**, v. 33, n. 2, p. 141-150, 2017.

PERRY, J. A. et al. Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 475-482, 2004.

PETTER, M.; DUFFY, M. F. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. **Pathogen-Host Interactions: Antigenic Variation v. Somatic Adaptations**, p. 47-90, 2015.

PHAM, T. T. et al. Hemozoin in malarial complications: more questions than

answers. **Trends in parasitology**, v. 37, n. 3, p. 226-239, 2021.

PHIMPRAPHI, W. et al. Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in a Karen population in Thailand. **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2008.

PICHYANGKUL, S. et al. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 8, p. 4926-4933, 2004.

PINZON-CHARRY, A. et al. Apoptosis and dysfunction of blood dendritic cells in patients with falciparum and vivax malaria. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 8, p. 1635-1646, 2013.

PIRES, C. V. et al. Blood-stage *Plasmodium vivax* antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. **PLoS One**, v. 13, n. 11, p. e0207244, 2018.

PRICE, R. N. et al. Vivax malaria: neglected and not benign. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 77, n. 6 Suppl, p. 79, 2007.

RANJAN, A.; CHITNIS, C.E. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 24, p. 14067-14072, 1999.

ROBBINS, R. A.; GRISHAM, M. B. Nitric oxide. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 29, n. 6, p. 857-860, 1997.

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

RODRIGUES, M. H. C. et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **International journal for parasitology**, v. 35, n. 2, p. 185-192, 2005.

RUBTSOVA, K. et al. T-box transcription factor T-bet, a key player in a unique type of B-cell activation essential for effective viral clearance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 34, p. E3216-E3224, 2013.

SANTO, A.; ZHU, H.; LI, Y. R. Free radicals: From health to disease. **React. Oxyg. Species**, v. 2, p. 245-263, 2016.

SANTOS, R. et al. Malaria vectors in two indigenous reserves of the Brazilian Amazon. **Revista de saude publica**, v. 43, p. 859-868, 2009.

\_\_\_\_\_. **Boletim epidemiológico. Malária: Monitoramento dos casos no**

**Brasil em 2014.** SAÚDE, S. D. V. E. Brasil. 46 2021.

\_\_\_\_\_. **Boletim epidemiológico. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2012 e 2013.** SAÚDE, S. D. V. E. Brasil. 46 2021.

SAYERS E. W., Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic Acids Res**, 2022.

SEDER, R. A. et al. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. **Science**, v. 341, n. 6152, p. 1359-1365, 2013.

SEIXAS, E. et al. Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. **European journal of immunology**, v. 31, n. 10, p. 2970-2978, 2001.

SEO, Y. B. et al. Crucial roles of interleukin-7 in the development of T follicular helper cells and in the induction of humoral immunity. **Journal of virology**, v. 88, n. 16, p. 8998-9009, 2014.

SERGHIDES, L. et al. CD36 and malaria: friends or foes?. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 10, p. 461-469, 2003.

SHAAN LAKSHMANAPPA, Y. et al. SARS-CoV-2 induces robust germinal center CD4 T follicular helper cell responses in rhesus macaques. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2021.

SHEN, F. et al. A Chimeric *Plasmodium vivax* merozoite surface protein antibody recognizes and blocks erythrocytic *P. cynomolgi* Berok merozoites in vitro. **Infection and Immunity**, v. 89, n. 2, p. e00645-20, 2021.

SIN, J. et al. Interleukin 7 can enhance antigen-specific cytotoxic-T-lymphocyte and/or Th2-type immune responses in vivo. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 5, p. 751-758, 2000.

SINDEN, R. E. Malaria, sexual development and transmission: retrospect and prospect. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1427-1434, 2009.

SINGH, B. et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in Malaysia. **Med J Malaysia**, v. 65, n. 3, p. 166-72, 2010.

SOARES, I. S. et al. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. **Am J Trop Med Hyg**, v. 60, n. 3, p. 357-63, 1999.

SOARES, I. S. et al. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. **Acta tropica**, v. 72, n. 1, p. 13-24, 1999.

SONG, C. et al. Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 23, p. 10809-10813, 1994.

SOUZA-SILVA, F. A. et al. Duffy antigen receptor for chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-duffy binding protein II (DBPII) immunity. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93782, 2014.

SPONAAS, A. et al. Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 114, n. 27, p. 5522-5531, 2009.

STEVENSON, Mary M.; RILEY, Eleanor M. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 169-180, 2004.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for

SU, Z.; STEVENSON, M. M. IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 3, p. 1348-1355, 2002.

SURETTE, F. A.; BUTLER, N. S. Temporally Evolving and Context-Dependent Functions of Cytokines That Regulate Murine Anti-Plasmodium Humoral Immunity. **Pathogens**, v. 11, n. 5, p. 523, 2022.

TADEI, W. P.; DUTARY THATCHER, B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: Anopheles of the subgenus Nyssorhynchus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 87-94, 2000.

TAKEDA, K.; KAISHO, T. A. S. **Toll-like receptors**. **annu rev immunol**, v. 21, p. 335-76, 2003.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TAN, J. T. et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 15, p. 8732-8737, 2001.

TAUIL, P. et al. A malária no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 1, p. 71-111, 1985.

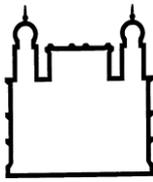
TESSARZ, A. S.; CERWENKA, A. The TREM-1/DAP12 pathway. **Immunology Letters**, v. 116, n. 2, p. 111–116, 2008.

TSUBOI, T. et al. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein. **Infection and immunity**, v. 62, n. 12, p. 5581- 5586, 1994.

TYLER, J. S.; TREECK, M.; BOOTHROYD, J. C. Focus on the ringleader: the role

- of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 9, p. 410-420, 2011.
- VELLA, A. T. et al. Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 7, p. 3810-3815, 1998.
- VICENTIN, E. C. et al. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 expressed in *Pichia pastoris* yeast. **Infect Immun**, v. 82, n. 3, p. 1296-307, Mar 2014.
- VLACHOU, D. et al. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. **Current opinion in genetics & development**, v. 16, n. 4, p. 384-391, 2006.
- WHITE, M. T. et al. Modelling the contribution of the hypnozoite reservoir to *Plasmodium vivax* transmission. **Elife**, v. 3, p. e04692, 2014.
- WHO. **World Malaria Report**. Geneva 2021.
- WILLY, P. J. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. **Genes Dev**, v. 9, p. 1033-1045, 1995.
- WILSON, J. N. et al. Analysis of IL10 haplotypic associations with severe malaria. **Genes & Immunity**, v. 6, n. 6, p. 462-466, 2005.
- WIPASA, J. et al. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 2, p. e1000770, Feb 19 2010.
- WYKES, M.; GOOD, M. F. A case for whole-parasite malaria vaccines. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 7, p. 705-712, 2007.
- YADAVA, A. et al. A novel chimeric *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. **Infection and immunity**, v. 75, n. 3, p. 1177-1185, 2007.
- YAMAGISHI, J. et al. Interactive transcriptome analysis of malaria patients and infecting *Plasmodium falciparum*. **Genome research**, v. 24, n. 9, p. 1433-1444, 2014.
- YAP, X. Z.; HUSTIN, L. S. P.; SAUERWEIN, R. W. TH1-polarized TFH cells delay naturally-acquired immunity to malaria. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1096, 2019.
- LUO, J. et al. Effect of a single oral dose of rabeprazole on nocturnal acid breakthrough and nocturnal alkaline amplitude. **World journal of gastroenterology**, v. 9, n. 11, p. 2583, 2003.

## **ANEXO 1- Termo de consentimento livre e esclarecido assinado por todos os participantes do estudo**



Ministério da Saúde

**Fundação Oswaldo Cruz**

Centro de Pesquisas René Rachou

Laboratório de Malária

---

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa sobre a “**Malária na Amazônia: estudo longitudinal dos fatores relacionados ao hospedeiro, parasito e comorbidade influenciando na resposta imune protetora**”, que é coordenado pelas Dras. Flora Satiko Kano e Luzia Helena Carvalho, pesquisadoras do Instituto René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz de Belo Horizonte, Minas Gerais (IRR/FIOCRUZ Minas).

Você foi selecionado para participar deste projeto de pesquisa porque reside na comunidade de Rio Pardo, município de Presidente Figueiredo. Mas, sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com a equipe da pesquisa ou com a Instituição.

O objetivo deste estudo é saber se o seu sistema imune (que é a parte do seu corpo que é responsável por combater os micróbios) ainda lembra que você teve a doença (esta lembrança do seu organismo é chamada de memória). Além disso, queremos ver se as viroses ou os micróbios do seu intestino (bactérias intestinais) influenciam na maior ou menor chance de ter malária. Isto é importante para saber se as vacinas que estão sendo desenvolvidas podem ser eficientes para induzir esta memória (sem isto as vacinas podem não ser protetoras contra a doença) ou proteção contra a malária.

Caso você aceite participar, a sua participação nesta pesquisa consistirá em responder a um questionário onde constam perguntas, tais como, sua idade, se teve ou não a doença no período desde 2008. Além disto iremos coletar o seu sangue. Vamos coletar cerca de 4 tubos de sangue (cerca de 40 ml no total, isto é, cada tubo corresponde a cerca de uma colher de sopa de sangue). Esta quantidade de sangue retirada não causa nenhum problema a sua saúde. A coleta de sangue vai ser realizada com tubos descartáveis e todo o material também é descartável, incluindo agulhas e as luvas usadas pela nossa equipe de pesquisa. A coleta de sangue pode gerar um certo desconforto no momento

da picada da agulha e existe a possibilidade de formação de um “rouxidão” no local da punção. Entretanto, todas as providências serão tomadas para diminuir ao máximo estas possibilidades. Nossa equipe sabe coletar bem o sangue e tem muita experiência nisto. Além do material ser descartável nós vamos limpar bem a sua pele com álcool (fazer antissepsia), no local da picada, para evitar a possibilidade de contaminação no momento da coleta. Caso a coleta de sangue deixe uma rouxidão no seu braço, este efeito é temporário e não vai ficar muito tempo no seu braço. Mas, caso esta coleta de sangue leve a algum dano em você, nós vamos indenizá-lo de acordo com os termos legais vigentes no Brasil. Além disso, estamos pedindo um pouco das suas fezes para ser coletado no frasco novo e estéril de coleta de fezes que estamos fornecendo. Pedimos para guardar o frasco com as fezes na geladeira e um membro da equipe irá buscar na sua casa.

Você ou sua comunidade terão como benefício direto e imediato relacionado a esta pesquisa, a busca ativa de casos de malária do sangue coletado por meio do diagnóstico imediato e, quando positivo será realizado o tratamento para malária, assim como a orientação sobre informações básicas de prevenção à doença. Além disso, sua participação é importante porque este estudo poderá contribuir, a longo prazo, para o desenvolvimento futuro de uma vacina contra a malária. Você também poderá ter acesso aos resultados da nossa pesquisa. Para isto basta que entre em contato conosco e nós podemos lhe explicar os resultados pessoalmente, por escrito ou por telefone.

O material que sobrar do seu sangue e das suas fezes, nós estamos pedindo a sua autorização para não jogar fora, mas guardar apropriadamente no nosso laboratório. Este material (resto do seu sangue e das fezes) será mantido a baixas temperaturas para ser conservado e poderá ser usado em pesquisas futuras relacionadas a este projeto. Caso nós decidirmos fazer outro projeto de pesquisa, nós voltaremos e iremos pedir novamente a sua autorização para usar o sangue estocado. Quando isto acontecer você poderá aceitar ou não que utilizaremos o seu sangue guardado. Você será sempre o dono da sua amostra guardada no nosso laboratório e nós seremos apenas os guardiões e vamos cuidar para que esta amostra de sangue seja bem preservada ao longo dos anos. A qualquer momento também você poderá nos solicitar que não guarde mais o material proveniente do seu sangue. Neste caso, nos descartaremos apropriadamente a sua amostra.

Se você participou das pesquisas anteriores de 2008-2009 “Dinâmica da infecção pelo *Plasmodium vivax* em área de assentamento agrícola do Amazonas: caracterização da resposta imune contra a *Duffy binding protein* (PvDBP), proteína responsável pela invasão do *P. vivax* nos eritrócitos”, pedimos seu consentimento para utilizar suas amostras biológicas que estão armazenadas em nosso biorrepositório para serem utilizadas no atual estudo.

Pedimos também seu consentimento, caso haja necessidade, de enviar o seu material biológico para fora do país (EUA) para ser utilizado em um teste para entender como a resposta protetora e de longa duração à malária é adquirida e mantida. Todo material enviado para o exterior e não utilizado será

destruído e/ou reenviado para nosso laboratório para ser guardado.

As suas informações obtidas mediante essa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua identidade durante todas as etapas desta pesquisa. Todos os dados serão mantidos com acesso restrito onde somente o pesquisador principal terá o acesso de sua identidade. Os dados que serão divulgados não serão associados com qualquer informação de sua identificação, sendo o seu sangue, as fezes e os dados obtidos identificadas com um código, conhecido somente pelo responsável por esta pesquisa.

Este termo será assinado em duas vias, bem como todas as páginas serão rubricadas, tanto pelos pesquisadores responsáveis/pessoa por ele delegada desta pesquisa (Dra. Flora Satiko Kano e Dra. Luzia Helena Carvalho) e por você participante da pesquisa. Uma via ficará retida com os pesquisadores responsáveis e a outra via do termo com você. Neste termo consta os telefones e o endereço institucional das coordenadoras desta pesquisa (Dra. Flora Satiko Kano e Dra. Luzia Helena Carvalho) e do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da nossa instituição (Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier, Presidente). A qualquer momento, você poderá nos ligar para tirar suas dúvidas sobre sua participação, esta pesquisa ou a doença.

\_\_\_\_\_  
Flora Satiko Kano e Luzia Helena

Carvalho Coordenadoras do Projeto

Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz-MG

Av. Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, CEP: 30190-002 Belo

Horizonte Fone (31) 3349-7793 ou 3349-7802 / (31) 91974144 ou

99222-3143

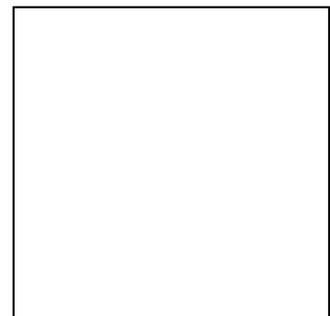
Comitê de Ética, Presidente, Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier: (31) 3349-7783

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

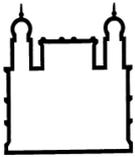
Rio Pardo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome do voluntário da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário



## ANEXO 2- Questionário aplicado aos indivíduos participantes do estudo



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Laboratório de Malária

---

Indivíduo N<sup>o</sup> \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ /20\_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_

Apelido \_\_\_\_\_

Idade \_\_\_\_\_ Sexo (1) F (2) M Cor (1) branca (2) parda (3) negra (4) indígena (5) amarela

Peso (kg) \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_

Atividade profissional/ocupação: \_\_\_\_\_

Ramal \_\_\_\_\_ UD no. \_\_\_\_\_

Localização GPS \_\_\_\_\_

---

### No momento da coleta:

Tem algum sintoma? (1) sim (2) não

Há quantos dias com sintomas? \_\_\_\_\_ Quais?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Resultado da lâmina: \_\_\_\_\_ parasitemia \_\_\_\_\_

No. SIVEP \_\_\_\_\_

Malária aguda (1) sim (2) não (3) duvidoso Espécie: \_\_\_\_\_

---

**Você já teve malária** (1) sim (2) não (3) duvidoso

Quantas vezes? \_\_\_\_\_

Espécie da última malária? (1) *P.vivax* (2) *P.falciparum* (3) não sabe (9) não se aplica

Quando foi sua última

malária? \_\_\_\_\_

Teve Sintomas (1) sim (2) não

Quais? \_\_\_\_\_

Você concluiu o tratamento (1) sim (2) não (3) não sabe (9) não se aplica

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_ Qual medicamento utilizado? \_\_\_\_\_

Você teve malária desde agosto de 2019? (1) Não (2) Sim quantas? \_\_\_\_\_ (3) não sabe

Qual espécie? (1) *P.vivax* (2) *P.falciparum* (3) não sabe (9) não se aplica

Você chegou a ser hospitalizado por malária? (1) Sim (2) Não (3) Não sabe (9) Não se aplica

Se sim, por quanto

tempo? \_\_\_\_\_

Município de contágio? \_\_\_\_\_

Como você pegou

malária? \_\_\_\_\_

Você viajou nos últimos 90 dias? (1) não (2) sim Qual município? \_\_\_\_\_

Você reside em Rio Pardo? (1) Sim (2) Não

Há quantos anos você reside em RP? \_\_\_\_\_

No últimos 30 dias usou algum meio para diminuir as picadas de mosquitos? (1) sim todos os dias.

Qual (is): \_\_\_\_\_ (2) não (3) não sabe

---

Apresentou nos últimos cinco anos, alguma doença grave?

(1) Sim (2) Não (3) Não sabe (9) Não se aplica

Se sim,

qual? \_\_\_\_\_

Está com alguma infecção/problema de saúde?

(1) Sim (2) Não (3) Não sabe (9) Não se aplica

Sinais/sintomas? \_\_\_\_\_

Está fazendo uso de algum medicamento anti-inflamatório? (1) Sim (2) Não (3) Não sabe

Se sim, qual? \_\_\_\_\_ Há quanto tempo?

\_\_\_\_\_

Fez uso de antibiótico nos últimos 6 meses? (1) não (2) sim Qual?

\_\_\_\_\_

—

---

Está com sintomas de gripe? (1) Sim (2) Não (3) duvidoso

Esteve em contato com pessoas com diagnóstico ou sintomas de Covid-19 nos últimos 14 dias?

**Você já teve Covid-19** (1) sim (2) não (3) duvidoso

(1) sim (2) não (9) não se aplica

Se teve Covid, quais foram os sintomas?

\_\_\_\_\_

Se teve Covid, quanto tempo atrás? \_\_\_\_\_

Você chegou a ser hospitalizado por causa da Covid-19? (1) sim (2) não (9) não se aplica

Por quanto tempo? \_\_\_\_\_ Qual medicamento ou terapia utilizada? \_\_\_\_\_

Quantas pessoas na sua família pegaram Covid?

\_\_\_\_\_

Já fez exame para Covid-19? (1) sim (2) não (9) não se aplica

Qual teste? ( ) Teste rápido ( ) swab

Qual foi o resultado? ( ) positivo ( ) negativo

Você já tomou vacina para Covid? (1) Sim (2) Não (3) Não sabe (9) Não se aplica

Quantas doses? \_\_\_\_\_ Qual vacina? \_\_\_\_\_

---

Tem problemas de pressão alta? (1) sim (2) não Medicamento, qual?

Diabetes mellitus? (1) sim (2) não Medicamento? Qual?

Quais vacinas você já tomou?

Quais destes sintomas tem sentido nas ultimas 48 horas?

| Sintomas                  | Ausente | Leve | Moderado | Intenso |
|---------------------------|---------|------|----------|---------|
| Febre                     |         |      |          |         |
| Calafrios                 |         |      |          |         |
| Sudorese                  |         |      |          |         |
| Dor nas costas            |         |      |          |         |
| Dor no corpo              |         |      |          |         |
| Fraqueza                  |         |      |          |         |
| Dor de barriga            |         |      |          |         |
| Diarreia                  |         |      |          |         |
| Enjoos                    |         |      |          |         |
| Vômitos                   |         |      |          |         |
| Falta de Apetite          |         |      |          |         |
| Dor de cabeça             |         |      |          |         |
| Tontura                   |         |      |          |         |
| Tosse                     |         |      |          |         |
| Falta de ar               |         |      |          |         |
| Alteração cor da urina    |         |      |          |         |
| Coriza ou congestão nasal |         |      |          |         |
| Perda de olfato           |         |      |          |         |