



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

NAJARA CARNEIRO BITTENCOURT

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E IMUNOGENICIDADE DAS
PROTEÍNAS MAEBL E RON2 DE *Plasmodium vivax*

CAMPINAS

2017

NAJARA CARNEIRO BITTENCOURT

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E IMUNOGENICIDADE DAS
PROTEÍNAS MAEBL E RON2 DE *Plasmodium vivax***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Imunologia.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA NAJARA CARNEIRO BITTENCOURT
E ORIENTADA PELO PROF. DR. FABIO TRINDADE
MARANHÃO COSTA.

Orientador: FABIO TRINDADE MARANHÃO COSTA

Co-Orientador: LETUSA ALBRECHT

CAMPINAS

2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B548a Bittencourt, Najara Carneiro, 1990-
Análise da diversidade genética e imunogenicidade das proteínas MAEBL e RON2 de *Plasmodium vivax* / Najara Carneiro Bittencourt. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Fabio Trindade Maranhão Costa.

Coorientador: Letusa Albrecht.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Malária. 2. *Plasmodium vivax*. 3. Antígeno MAEBL. 4. Vacinas antimaláricas. 5. Variação antigênica. I. Costa, Fabio Trindade Maranhão, 1972-. II. Albrecht, Letusa. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Genetic diversity and immunogenicity analysis of MAEBL and RON2 of *Plasmodium vivax*

Palavras-chave em inglês:

Malaria

Plasmodium vivax

MAEBL antigen

Malaria vaccines

Antigenic variation

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Fabio Trindade Maranhão Costa [Orientador]

Jorg Kobarg

Gerhard Wunderlich

Data de defesa: 27-03-2017

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 27 de março de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

Prof. Dr. Gerhard Wunderlich

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais, pelo amor e incentivo em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Fabio Costa pela oportunidade e por todo auxílio prestado durante estes dois anos e por sempre incentivar e acreditar no potencial dos seus alunos.

À minha co-orientadora e amiga Letusa, pelas incontáveis vezes que me auxiliou do início ao fim deste projeto, por todos os conselhos sobre ciência e sobre a vida. Pela sua generosidade e compreensão. Minha profunda admiração pela profissional e pela pessoa que és!

Aos nossos colaboradores, em especial, ao Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e ao Prof. Dr. Marcelo Ferreira Urbano, do Laboratório de Parasitologia Experimental e Aplicada da Universidade de São Paulo (USP) por cederem as amostras de pacientes com malária.

Ao Instituto Carlos Chagas (Fiocruz- Paraná) por disponibilizar a infra-estrutura necessária para possibilitar a realização da etapa de expressão das proteínas recombinantes.

Aos amigos e colegas do LDT, Ju, João Conrado, Taty, Carol, Catarina, Carla, Gustavo, Kaira, Letícia e João Luiz por todos os momentos de convívio, por fazerem nosso time ser tão unido, pelos churrascos, bares e conversas e, é claro, por todas as discussões e auxílios científicos prestados.

À Ana Cristina por todos os auxílios prestados, pela sua organização e profissionalismo, que facilitaram a realização deste trabalho.

Aos colegas do LabREG pelo acolhimento e todo o auxílio durante os meses que estive em Curitiba. Em especial aos queridos Ana, Bia, Ize, Pri e Bruno. Obrigada pela parceria e pela disponibilidade. Foi um grande prazer conhecê-los!

À minha família que, mesmo com a distância, me apoiou e esteve presente na minha caminhada. Em especial ao meu Pai Adilmar por ser o meu apoio incondicional, pela sua sabedoria e conselhos e à minha amada mãe Neusa que não está mais presente fisicamente, mas que estará me guiando para sempre. Devo tudo a vocês!

Aos meus irmãos Allan e Maíra, por estarem sempre comigo, mesmo de longe, e aos meus pequenos e amados sobrinhos Gabi e Davi por toda a felicidade que vocês me proporcionam.

À Unicamp por possibilitar o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

À FAPESP pela bolsa fornecida durante esses dois anos de trabalho.

Muito Obrigada!

Este Trabalho contou com o apoio financeiro da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São
Paulo (FAPESP). Número do Processo: 2015/02808-0

RESUMO

No último ano foram estimados 212 milhões de casos de malária no mundo. *Plasmodium vivax* é responsável por 41% dos casos da doença fora do continente africano. Ao contrário do *Plasmodium falciparum*, as infecções causadas por *P. vivax* são raramente letais. No entanto, *P. vivax* tem um impacto significativo sobre a produtividade das populações locais. O surgimento de cepas resistentes às drogas agrava ainda mais a situação, desta forma intensifica-se a necessidade de investigações para obtenção de métodos de controle alternativos, como o desenvolvimento de vacinas. Diversas proteínas vêm sendo estudadas a fim de encontrar um bom candidato vacinal. MAEBL é uma molécula quimérica expressa em eritrócitos infectados. Possui dois domínios (M1 e M2) envolvidos no processo de invasão ao eritrócito, sendo o domínio M2 o principal envolvido na invasão do merozoíto, além de exibir alta capacidade adesiva. MAEBL também é expresso em esporozoítas das glândulas salivares e em hepatócitos infectados. Além disso, o gene *maebl* foi identificado em diferentes espécies de plasmódios. RON2 é uma proteína conservada no filo Apicomplexa, expressa em esquizontes tardios, secretada por organelas denominadas roptrias no merozoíto e também está envolvida no processo de invasão do eritrócito, quando AMA1 junto com proteínas RON estabelecem a estrutura “*moving junction*” que faz uma conexão entre o merozoíto e o eritrócito. As características de MAEBL e RON2 abrem perspectivas para o desenvolvimento de uma vacina experimental. Visando um bom candidato vacinal, torna-se importante caracterizar o padrão de diversidade genética das proteínas em estudo, bem como avaliar a imunogenicidade das mesmas. Para isso, a partir de amostras de sangue de indivíduos infectados por malária, foi realizado PCR de regiões dos genes *maebl* e *ron2* de *Plasmodium vivax*. Posteriormente foram sequenciados e avaliados quanto a sua diversidade. As proteínas MAEBL e RON2 foram expressas e testadas por ELISA, a fim de avaliar a sua imunogenicidade frente ao plasma de indivíduos infectados. Foi evidenciado, para ambos os genes, uma baixa diversidade genética. *Pvron2* não apresentou mutações não-sinônimas e *Pvmaebl* teve sete mutações não sinônimas. A prevalência de anticorpos IgM e IgG naturalmente adquiridos contra MAEBL foi de 4,54% para IgM e 55,6% para IgG total. Anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra RON2 estiveram presentes em 8,33% dos indivíduos analisados. Portanto, as proteínas MAEBL e RON2 se mostraram conservadas e imunogênicas, reafirmando estas proteínas como potenciais candidatos vacinais

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium vivax*, MAEBL, RON2, diversidade antigênica.

ABSTRACT

Last year, 212 million malaria cases were estimated worldwide. *Plasmodium vivax* accounts for 41% of the cases of the disease outside the African continent. Infections caused by *P. vivax* are rarely lethal. However, *P. vivax* has a significant impact on the productivity of local populations. The emergence of drug-resistant strains and complications on *P. vivax* infection make it extremely necessary to intensify research on definitive control methods such as the development of vaccines. Several proteins have been studied aiming to find a good vaccine candidate. MAEBL is a chimeric molecule expressed on infected erythrocytes that presents two domains involved in the erythrocyte invasion process (M1 and M2). M2 domain is the most important one for merozoite invasion, and it exhibits higher adhesiveness. Recently, it has been shown that MAEBL is also expressed in the salivary sporozoite gland and infected hepatocytes. Moreover, the gene that codifies MAEBL was identified in different *Plasmodium* species, including *P. vivax*. RON2 is a conserved protein that belongs to Apicomplexa phylum. It is expressed in late schizonts, secreted by organelles called roptries in the merozoite and it is also involved in the erythrocyte invasion process. In this process AMA-1 together with RON proteins establish the moving junction structure, which makes a connection between the merozoite and the erythrocyte. The characteristics of MAEBL and RON2 open perspectives for the development of an experimental vaccine. It is important to characterize the pattern of genetic diversity of these proteins, as well as to evaluate the immunogenicity of them in order to find a good vaccine candidate. For it to be possible, PCR and sequence analysis were performed. The MAEBL and RON2 proteins were expressed and tested by ELISA to evaluate their immunogenicity against the plasma of infected individuals. A low genetic diversity was evidenced for both genes. *Pvron2* did not present non-synonymous mutations and *Pvmaebl* presented 7 non-synonymous mutations. The reactivity indices of naturally acquired IgM and IgG antibodies against MAEBL were 4.54% for IgM and 55.6% for total IgG. IgG antibodies naturally acquired against RON2 were present in 8.33% of the individuals analyzed. Therefore, MAEBL and RON2 proteins are conserved and immunogenic, thus reaffirming them as potential vaccine candidates.

Key words: Malaria, *Plasmodium vivax*, MAEBL, RON2, antigenic diversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Áreas de transmissão da malária no mundo.....	17
Figura 2. Mapa de Risco de infecção por malária por municípios no Brasil.....	18
Figura 3. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> sp.....	21
Figura 4. Proteínas presentes no merozoíto em <i>Plasmodium vivax</i> e <i>Plasmodium falciparum</i>	22
Figura 5. Esquema da invasão do parasito ao eritrócito.....	24
Figura 6. Efeitos da diversidade genética em casos de malária e na eficiência de vacinas.....	26
Figura 7. Estrutura do gene <i>maebl</i> , produto e espécies que possuem o gene.....	36
Figura 8. Formação do complexo das proteínas AMA1 com RON2, RON4, RON5 e RON8 durante o processo de invasão do eritrócito.....	38
Figura 9. Amplificações de <i>Pvmaebl</i> (2.011-3.264nt)	54
Figura 10. Predição dos determinante antigênicos da proteína RON2.....	55
Figura 11. Amplificação de <i>Pvron2</i> (5481-6240nt).....	55
Figura 12. Alinhamento das sequências de MAEBL-M2 (594-1011aa) de isolados brasileiros de <i>P. vivax</i>	57
Figura 13. Alinhamento das sequências de MAEBL-M2 (594-1011aa) de isolados de <i>P. vivax</i>	57
Figura 14. Alinhamento das sequências de RON2 de isolados de <i>P. vivax</i>	58
Figura 15. Otimização da expressão das proteínas recombinantes.....	59
Figura 16. Análise de gel SDS-PAGE sob condições desnaturantes da proteína recombinante PvM2-MAEBL (594-1.011aa) após a purificação.....	61
Figura 17. Análise de gel SDS-PAGE sob condições desnaturantes do recombinante PvRON2(1828-2080aa) expresso e purificado e <i>Western blot</i>	62
Figura 18. Resultados do ensaio de adesão com proteínas MAEBL e RON2 recombinantes à eritrócitos.....	63
Figura 19. Índice de reatividade de IgG contra as proteínas PvMAEBL e PvRON2.....	64
Figura 20. Índice de reatividade de IgM contra a proteína PvMAEBL.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vacinas experimentais contra a malária vivax em desenvolvimento.....	30
Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos e tamanhos dos fragmentos amplificados na reação de Nested-PCR.....	41
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados no teste de amplificação de <i>Pvmaebl</i> (2.011-3.264nt).....	42
Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados no teste de expressão de <i>Pvmaebl</i> (2.011-3.264nt) por Nested-PCR.....	42
Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento do gene <i>Pvmaebl</i> (2.011-3.264nt) de <i>P. vivax</i>	43
Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação da sequência do gene <i>ron2</i> (5482-6240nt) de <i>P. vivax</i>	44
Tabela 7. Condições testadas na expressão de proteínas recombinantes.....	47
Tabela 8. Condições otimizadas para a expressão das proteínas MAEBL e RON2.....	60
Tabela S1. Lista de sequências utilizadas na análise de polimorfismos da proteína MAEBL.....	73
Tabela S2. Lista de sequências utilizadas na análise de polimorfismos da proteína RON2.....	74

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	16
1.1 Aspectos gerais sobre a malária	16
1.2 Malária vivax	18
1.3 Ciclo de vida do parasito	19
1.4 Processo de invasão dos eritrócitos por merozoítos	22
1.5 Diversidade Genética	25
1.6 Imunidade naturalmente adquirida	26
1.7 Vacinas contra a malária	28
1.8 Vacinas contra a malária vivax	30
1.8.1 Vacinas pré-eritrocíticas.....	31
1.8.2 Vacinas de estágio sanguíneo.....	32
1.8.3 Vacinas de bloqueio da transmissão.....	34
1.9 O antígeno MAEBL	35
1.10 O antígeno RON2	37
2. OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Áreas de Coleta das Amostras de <i>Plasmodium vivax</i>	40
3.2 Amostras	40
3.3 Extração de DNA	40
3.4 Diagnóstico molecular por Nested-PCR	41
3.5 Amplificação dos genes de interesse	42
3.5.1 Amplificação do gene <i>maebl</i> (2.011-3.264nt) de <i>P. vivax</i>	42
3.5.2 Amplificação de <i>Pvron2</i>	43
3.6 Purificação dos Produtos de PCR	44
3.7 Sequenciamento Automatizado	44
3.8 Análise dos Eletroferogramas	45
3.9 Alinhamento e identificação de polimorfismos	45

3.10 Clonagem e Transformação de <i>pvmaebl</i> e <i>pvron2</i>	46
3.11 Expressão das proteínas recombinantes	46
3.11.1 Teste de expressão em sistemas de expressão heterólogo bacteriano	46
3.11.2 <i>Western Blot</i> para confirmação da expressão das proteínas recombinantes	47
3.11.3 Expressão de RON2 em <i>E.coli</i> STAR BL21 (DE3).....	48
3.11.4 Expressão de MAEBL-M2 em <i>E.coli</i> Arctic Express (DE3).....	49
3.11.5 Purificação da proteína recombinante	49
3.11.6 <i>Western blot</i>	50
3.11.7 Tratamento com Uréia e MgCl ₂	50
3.12 Sequenciamento por espectrometria de massas	50
3.13 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos contra os antígenos MAEBL-M2 e RON2	51
3.14 Ensaio de ligação <i>in vitro</i>	52
3.15 Análise estatística	52
4– RESULTADOS	53
4.1 Amplificação das sequências <i>maebl</i> e <i>ron2</i> de isolados de <i>P. vivax</i>	53
4.1.1 Amplificação do gene <i>Pvmaebl</i> (2.011-3.264nt)	53
4.2.1 Predição da antigenicidade de RON2.....	54
4.2.2 Amplificação do gene <i>Pvron2</i> (5481-6240nt).....	55
4.3 Análise das sequências	56
4.3.1 Análise das sequências correspondentes ao domínio M2 de MAEBL de isolados de <i>P. vivax</i>	56
4.3.2 Alinhamento das sequências de RON2 de isolados de <i>P. vivax</i>	58
4.4 Padronização da expressão das proteínas recombinantes	58
4.5 Expressão das proteínas recombinantes	60
4.5.1 Expressão da proteína PvMAEBL-M2 em ARCTIC Express	60
4.5.2 Expressão da proteína RON2 em <i>E.coli</i> STAR	61
4.6 Ensaio de ligação <i>in vitro</i>	62
4.7 Avaliação da resposta imune contra as proteínas recombinantes	63
4.7.1 Resposta imune contra as proteínas PvMAEBL-M2 e PvRON2.....	63

5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÕES.....	72
7. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	73
8. REFERÊNCIAS	75
9. ANEXOS	87

1- INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre a malária

A malária é transmitida por mosquitos fêmea pertencentes ao gênero *Anopheles*, ordem Diptera, família Culicidae. Existem mais de 400 espécies de *Anopheles* e dessas 70 são vetores da malária. No Brasil, a espécie mais prevalente é o *A. darlingi* (PAHO and WHO, 2014; WHO, 2014), seguida por *A. aquasalis* e *A. albitarsis* (WHO, 2014). No continente africano, onde ocorre o maior número de casos, as espécies prevalentes são *A. gambiae*, seguido por *A. funestus* e *A. arabiensis* (Coetzee et al., 2000; WHO, 2014).

O agente causador da malária é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, ordem Coccidia, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Cinco espécies são responsáveis por causar malária em humanos. Quatro delas, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, e *Plasmodium ovale*, são transmitidas pelo mosquito para os humanos durante o repasto sanguíneo. Porém, no sudeste asiático foram reportados casos de malária em humanos causada por *P. knowlesi*, que geralmente infecta macacos (Kantele and Jokiranta, 2011). Informações recentes, relataram que neste caso de infecção por *P. knowlesi*, a doença se propaga quando um mosquito *Anopheles* infectado por um macaco pica um ser humano (transmissão zoonótica) (WHO, 2015). Entre as espécies infectam humanos, *P. falciparum* e *P. vivax* são as que causam doença com maior frequência, sendo *P. falciparum* o principal responsável por causar doença grave (Murray et al., 2012).

Os sintomas clínicos da doença ocorrem com a ruptura dos esquizontes e destruição dos eritrócitos. Inicialmente é observado cefaleia, fadiga, desconforto abdominal, dores musculares e nas articulações, febre, calafrios, transpiração e náuseas. Estes sintomas são inespecíficos e assemelham-se aos de uma infecção viral comum, o que pode dificultar o diagnóstico (WHO, 2010). Crianças pequenas podem apresentar diminuição do apetite, tosse e letargia. Se o tratamento da doença for inadequado, a doença pode evoluir para a forma grave, que se manifesta com a apresentação de uma ou mais das seguintes manifestações clínicas: coma (malária cerebral), acidose metabólica, anemia severa, hipoglicemia, insuficiência renal aguda, edema pulmonar. A malária grave é causada, principalmente, por *P. falciparum* (WHO, 2010). Os casos graves de malária causadas por *P. vivax* são raros e se apresentam com maior frequência como anemia grave e insuficiência respiratória (Naing et al., 2014).

Entre as doenças transmitidas por insetos, a malária permanece entre uma das principais parasitoses humanas, tanto em termos de mortalidade quanto de morbidade. Em 2015 foram

reportados mundialmente 212 milhões de casos de malária e 429 mil mortes. A maioria dos casos relatados ocorreram na África (90%), bem como a maior parte dos casos de morte (92%) (WHO, 2016). Populações em desenvolvimento e situadas em regiões tropicais e subtropicais do globo são as principais afetadas (**Figura 1**). Nestas áreas as condições ambientais favorecem o desenvolvimento do agente causador da doença bem como do seu transmissor, o mosquito anophelino (Snow et al., 2005).

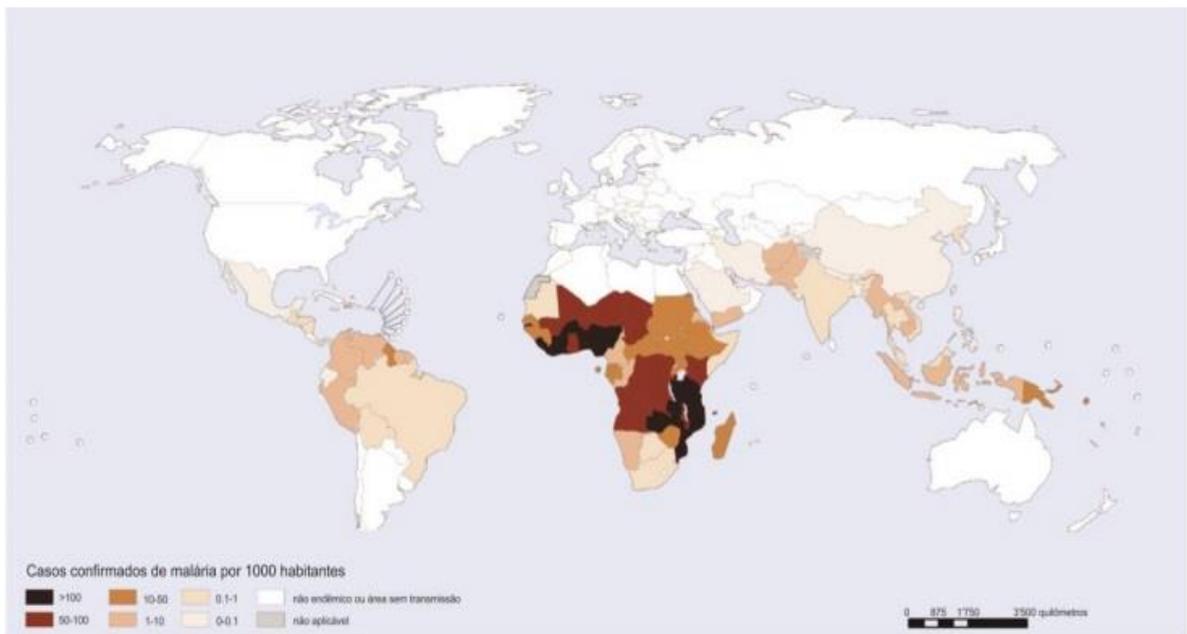


Figura 1. Áreas de transmissão da malária no mundo. No mapa é visto as áreas de maior incidência de malária de acordo com os números de casos reportados por 1000 habitantes.

Fonte: WHO, 2014 adaptado.

A malária é endêmica em 21 países das Américas. Em 2015, 132 milhões de pessoas estiveram sob risco de infecção e 21 milhões sob alto risco (WHO, 2016), sendo 452.512 casos confirmados e 98 mortes por malária na região das américas. Destes, 126.211 foram casos de infecção por *P. vivax* e 16.793 por *P. falciparum* relatados no Brasil sendo confirmadas ao total 37 mortes no país (WHO, 2016).

No Brasil, a transmissão da malária ocorre com maior prevalência na região amazônica (99,8%) (Oliveira-Ferreira et al., 2010). Grandes avanços e conquistas foram obtidos na última década para o controle da malária, tendo sido observado uma diminuição de 76,6% nos casos entre os anos 2000 e 2014. Porém, o país ainda é responsável por 24% dos casos de malária reportados nas Américas (WHO, 2015, 2016) (Figura 2).

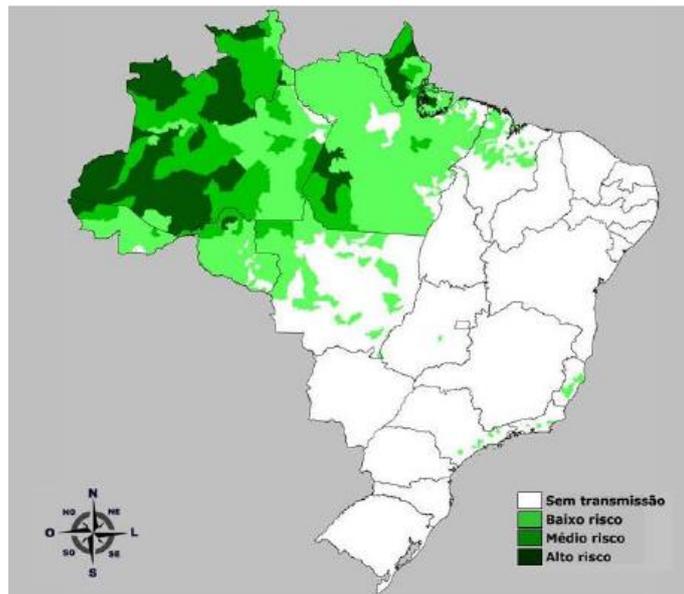


Figura 2. Mapa de Risco de infecção por malária por municípios no Brasil. Fonte: Sinan/SVS/MS e Sivep-Malária/SVS/MS (<http://portalsaude.saude.gov.br>).

1.2 Malária vivax

Atualmente o *Plasmodium vivax* é a espécie predominante em países fora do continente Africano. Esta predominância ocorre devido a alguns aspectos da biologia do parasito: 1) a sua capacidade de gerar formas dormentes (hipnozoítos), que podem permanecer em latência durante meses ou até mesmo anos; 2) seu alto potencial de transmissão, devido a formação de gametócitos logo no início da infecção; 3) a alta infectividade em mosquitos; 4) o ciclo de vida mais curto no hospedeiro invertebrado quando comparado a outras espécies; e 5) uma capacidade maior de sobrevivência em temperaturas mais baixas (WHO, 2014). Embora exista *P. vivax* no continente africano, o risco de infecção por esta espécie é muito baixo devido à ausência do gene *Duffy* na população local. Este gene codifica uma proteína necessária para que o parasito possa invadir as hemácias nos seres humanos.

Nas Américas, infecções causadas por *P. vivax* são mais comuns do que por *P. falciparum* e causam alta morbidade trazendo prejuízos significativos ao desenvolvimento socioeconômico da região (WHO, 2015). Atualmente, no Brasil, a transmissão da malária ocorre quase exclusivamente na região amazônica (99,8%) e responde por pouco mais da metade do total de casos notificados nas Américas, onde o principal agente causador é o

Plasmodium vivax (Oliveira-Ferreira et al., 2010). Em 2015 foram relatados no Brasil 126.211 casos de malária vivax (WHO, 2016).

A reincidência da doença devido a emergência de hipnozoítos contribui para cerca de 80% de todos os casos de infecções causadas por *P. vivax* em estágio sanguíneo (Mueller et al., 2015). Não existem testes que diagnosticam hipnozoítos e a única droga disponível atualmente contra esta forma é a primaquina, que pode causar hemólise severa em pessoas com deficiência na glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Baird et al., 2012). A droga contra hipnozoítos que está em desenvolvimento clínico é a tafenoquina, mas assim como a primaquina, oferece risco de hemólise (Llanos-Cuentas et al., 2014). Hoje em dia, o tratamento de primeira linha para *P. vivax* é a cloroquina combinada com a primaquina.

Embora a mortalidade por *P. vivax* seja considerada baixa quando comparada à infecção por *P. falciparum*, sua morbidade é significativa e crescente principalmente devido ao desenvolvimento de resistência do parasito à cloroquina. Recentemente, vem sendo relatado em vários países o aumento do número de casos de complicações graves em infecções causadas por *P. vivax*, que incluem anemia, síndrome respiratória, desnutrição, malária cerebral e até mesmo morte (Alexandre et al., 2010; Costa et al., 2012; Genton et al., 2008). No caso específico do Brasil, existem relatos de formas graves e letais por *P. vivax*, sendo que as principais complicações relatadas foram alterações hematológicas, ruptura esplênica, alterações renais e pulmonares (Lacerda et al., 2012; Siqueira et al., 2010). Observações globais de complicações clínicas, que normalmente são associadas as infecções por *P. falciparum*, desafiam a visão pré-estabelecida de que *P. vivax* é um parasito "benigno" (Anstey et al., 2009; Mendis et al., 2001; Mueller et al., 2009). Este fato tem renovado o interesse do entendimento da imunopatogênese e da infectividade de *P. vivax*. No entanto, devido a inexistência de um sistema de cultivo de longa duração *in vitro* que seja confiável e reprodutível (Mueller et al., 2009) o estudo da biologia de *P. vivax*, por meio da realização de ensaios funcionais permanece restrito, o que configura a dificuldade do desenvolvimento de novas drogas e vacinas.

1.3 Ciclo de vida do parasito

O ciclo de vida do *Plasmodium* é bastante complexo e envolve vários estágios de desenvolvimento no hospedeiro humano e no mosquito vetor (Figura 3). A fase assexuada ocorre no hospedeiro humano, em células parenquimatosas do fígado (esquizogonia hepática)

ou nos eritrócitos (esquizogonia eritrocitária). A fase sexuada, ocorre nos mosquitos fêmea do gênero *Anopheles*.

O ciclo no hospedeiro mamífero se inicia quando um mosquito do gênero *Anopheles* injeta no hospedeiro, durante o repasto sanguíneo, os parasitos na forma de esporozoíto, que se movem para a derme, atingem a corrente sanguínea e migram até o fígado. Uma vez na corrente sanguínea, os esporozoítos alcançam os sinusóides hepáticos. Moléculas envolvidas no processo de captura do parasito vem sendo estudadas. A principal proteína de superfície do esporozoíto, a proteína circunsporozoíta (CSP), tem papel essencial neste processo ao interagir com as proteoglicanas de heparan sulfato (HSPGs) das células do fígado, que são os principais receptores para *Plasmodium* nos sinusóides. Posteriormente, observou-se que CSP e a proteína anônima relacionada à trombospondina (TRAP) reconhecem não apenas proteoglicanos nos hepatócitos, mas também nas células de Kupffer e células estreladas (Prudêncio et al., 2006). Após o sequestro do parasito, os esporozoítos invadem os hepatócitos, onde permanecem por 9 a 16 dias (Tuteja, 2007) e então se diferenciam e se dividem assexuadamente por esquizogonia em milhares de merozoítos que invadirão os eritrócitos (Cowman and Crabb, 2006; Prudêncio et al., 2006). Na fase hepática, *P. vivax* e *P. ovale* podem desenvolver uma forma dormente chamada hipnozoíto, que pode causar infecções após semanas, meses ou até mesmo anos inativo (Mueller et al., 2009).

Os merozoítos entram nas células sanguíneas por um processo complexo de invasão que envolve diversas proteínas. Dentro do eritrócito, ocorre reprodução assexuada e o parasito se desenvolve em diferentes estágios. Os trofozoítos jovens são visualizados, morfologicamente, em forma de anel, neste estágio o parasito tem o metabolismo muito ativo, ocorrendo glicólise de grande quantidade da glicose importada, ingestão do citoplasma do hospedeiro e proteólise da hemoglobina em aminoácidos. O parasito não tem capacidade de degradar o heme, que é tóxico ao parasito. Desta forma, durante a degradação da hemoglobina, parte do heme é polimerizado em hemozoína (pigmento malárico) que é estocado em vacúolos. No fim deste estágio, ocorrem múltiplas divisões nucleares resultando na formação de esquizontes. Cada esquizonte contém cerca de 20 merozoítos, que após a lise do eritrócito, irão infectar novos eritrócitos (Tuteja, 2007). No caso do *P. vivax*, apenas os eritrócitos jovens (reticulócitos) são infectados. Alguns merozoítos, após invasão dos eritrócitos, não evoluem para esquizontes, mas diferenciam-se nas formas sexuadas do parasito, os gametócitos feminino e masculino.

Os micro e macrogametócitos (masculino e feminino, respectivamente), são essenciais na transmissão do parasito do mosquito fêmea para o hospedeiro mamífero. Os gametócitos podem ser visualizados entre o 10º e 12º dia em *P. falciparum*, após o 5º dia em *P. vivax* e *P.*

ovale e entre o 5º a 23º dia em *P. malariae*, contando a partir do primeiro contato do parasito com o hospedeiro. Na fase sexual, os mosquitos fêmeas, durante o repasto sanguíneo, ingerem os gametócitos e no intestino médio os macrogametócitos se transformam em macrogametas e os microgametócitos em microgametas. Os gametas se fundem e, através da fertilização, formam um zigoto. Este se transforma em um oocineto que penetra na parede das células do intestino médio, desenvolvendo-se em oocisto. A etapa subsequente se chama esporogonia, nela os oocistos produzem esporozoítos que são liberados na hemolinfa do inseto, e alcançam as glândulas salivares, e com a picada do mosquito, outro hospedeiro será infectado e o ciclo do parasito reiniciará (Tuteja, 2007).

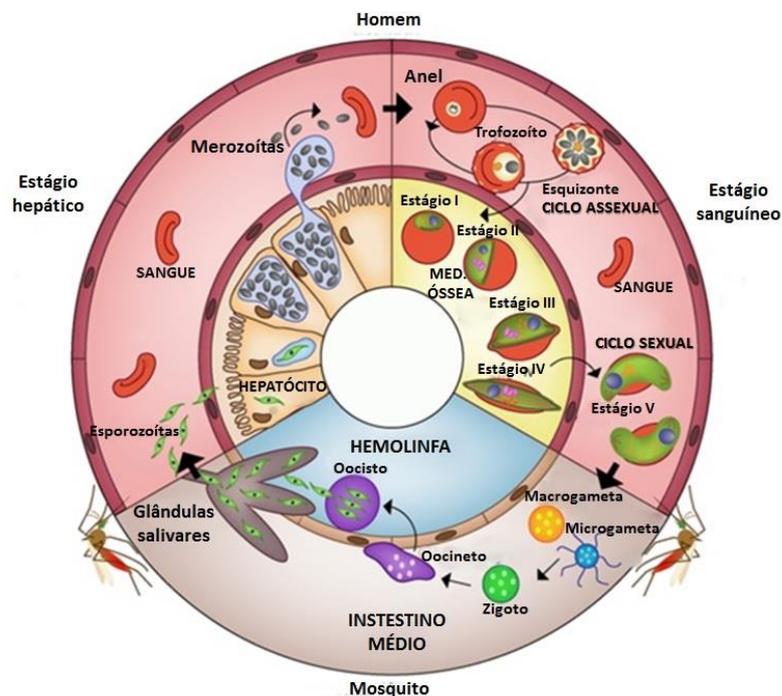


Figura 3. Ciclo de vida do *Plasmodium* sp. O parasito é transmitido para o humano quando uma fêmea do gênero *Anopheles* infectada injeta esporozoítas na pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Os esporozoítas invadem os hepatócitos onde desenvolvem-se e reproduzem-se assexuadamente. Após sete dias, aproximadamente, cada hepatócito infectado gera cerca de 40000 merozoítos que entram na corrente sanguínea e rapidamente invadem eritrócitos e começam repetidos ciclos de reprodução assexuada. Durante 48h, o parasito passa pelos estágios de anel e trofozoíto e por fim se replica em merozoítos no estágio de esquizonte (esquizogonia). O eritrócito infectado se rompe e libera merozoítos na circulação, começando um novo ciclo de reprodução assexuada. Durante cada ciclo, um pequeno subconjunto de parasitos desvia-se da replicação assexuada e, em vez disso, produz progênie sexual que diferencia o ciclo seguinte em formas sexuais masculinas e femininas. Os parasitos saem da circulação periférica e entram no espaço extravascular da medula óssea, onde os gametócitos amadurecem e progridem nos estádios I-V ao longo de oito a dez dias (gametocitogênese). No estágio V, os gametócitos masculinos e femininos retornam à circulação periférica, onde se tornam competentes para a infecção de mosquitos. Uma vez ingerido por um mosquito, os gametócitos femininos e masculinos rapidamente se tornam gametas (gametogênese). Dentro

do intestino médio, o gametócito masculino divide-se em microgametas flagelados, enquanto o gametócito feminino desenvolve-se em um único macrogameta. A fertilização de um macrogameta por um microgameta resulta na formação de um zigoto, que sofre meiose e se desenvolve em um oocineto, que penetra na parede do intestino do mosquito. O oocineto forma um oocisto dentro do qual o parasito se reproduz assexuadamente, formando vários milhares de esporozoítos (esporogonia). O oocisto se rompe e os esporozoítos migram para as glândulas salivares, onde podem ser transmitidos de volta para o hospedeiro humano. Adaptado de (Nilsson et al., 2015).

1.4 Processo de invasão dos eritrócitos por merozoítos

O processo de invasão do parasito ao eritrócito é complexo e envolve inúmeras moléculas que interagem com receptores específicos nas células do hospedeiro. Três organelas presentes no complexo apical do merozoítos chamadas roptrias, micronemas e grânulos densos (Figura 4) são responsáveis pela liberação de proteínas que têm papel crucial na invasão (Preiser et al., 2000). Este processo é dividido, basicamente, em três etapas: I- Adesão inicial do parasito à superfície do eritrócito, II- Reorientação do merozoítos, III- Formação da junção e eventos relacionados (Mitchell et al., 2004) (Figura 5).

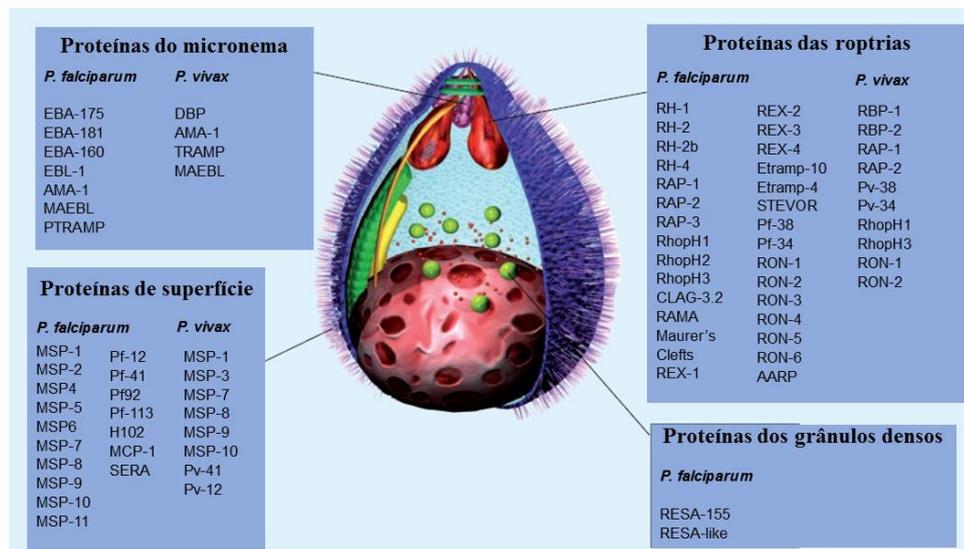


Figura 4. Proteínas presentes no merozoítos em *P. vivax* e *P. falciparum*. A imagem mostra a localização das proteínas no merozoítos (micronema, superfície, roptrias e grânulos densos) bem como em quais espécies são encontradas. Adaptada de (Patarroyo et al., 2012).

A primeira etapa no processo de invasão do eritrócito ocorre quando o merozoítos se liga ao eritrócito através de interações moleculares específicas que reconhecem a célula hospedeira. Esta ligação inicial pode ocorrer em qualquer parte da superfície do merozoítos, que apresenta

um revestimento denso de proteínas, como a proteína de superfície do merozoíto (MSP)-1, que é a proteína mais abundante na superfície (O'Donnell et al., 2000). Existem evidências que sugerem MSP-1 ser a responsável por realizar o primeiro contato com o eritrócito. Trabalhos demonstraram que anticorpos produzidos contra a proteína MSP-1 conferiram proteção contra o parasito em camundongos (Daly and Long, 1993) e macacos (Kumar et al., 1995). Estes resultados demonstram o papel crucial desta proteína na invasão, apesar dos mecanismos de interação exatos não estarem bem elucidados.

Em um segundo momento, acontece a reorientação do merozoíto. Esta etapa é necessária para que o polo apical do parasito entre em contato com a membrana do eritrócito, possibilitando a invasão (Gaur et al., 2004). Por mais que as interações moleculares, que ocorrem no momento da reorientação não sejam ainda bem elucidadas, já foi comprovado que AMA-1, possivelmente, é responsável pela reorientação ou que esta molécula inicia o contato de junção (Mitchell et al., 2004).

Na terceira etapa, após o polo apical estar na orientação correta, é formada uma junção irreversível entre o merozoíto e a membrana do eritrócito. A proteína AMA-1, juntamente com as proteínas RONs (do inglês *rhoptry neck protein*) participam da formação do complexo que permite a invasão do merozoíto. RON-2, RON-4 e RON-5 são inseridas junto a membrana do eritrócito, e após a ligação de AMA-1 com a RON-2, forma-se uma estrutura em forma de anel (Gaur and Chitnis, 2011). Após a formação da junção, o motor de actina-miosina é estimulado, movendo-se da extremidade anterior à posterior do merozoíto, levando este para dentro do eritrócito, no vacúolo parasitóforo. A etapa final da invasão consiste na selagem do vacúolo e da membrana do eritrócito (Miller et al., 2002).

Existem diferenças no processo de invasão entre as espécies de *Plasmodium*. *P. vivax* invade apenas reticulócitos *Duffy* positivos, enquanto *P. falciparum* pode invadir qualquer eritrócito. Uma diferença similar é vista em *P. yoelii* virulento e não-virulento. Ambos invadem preferencialmente reticulócitos, porém, quando não há mais reticulócitos disponíveis, *P. yoelii* virulentos podem invadir qualquer eritrócito, causando um grande aumento na parasitemia e podendo levar a morte.

Existem duas famílias de receptores presentes durante a invasão por *P. vivax* (Miller et al., 2002). São elas a superfamília DBL (do inglês, *Duffy-binding-like*) e a RBL (do inglês, *Reticulocyte binding like*).

A superfamília DBP recebe este nome, devido ao fato das proteínas desta família apresentarem um motivo de ligação ao antígeno Duffy. Em *P. vivax*, esta família é constituída pela proteína DBP, a qual interage com o receptor DARC (do inglês *Duffy antigen receptor for*

chemokines), presente na superfície dos reticulócitos. Em *P. falciparum*, esta família é formada pelas proteínas EBA-175, BAEBL/EBA-140, JESEBL/EBA-181 e EBL-1.

A família RBP contém as proteínas RBPs em *P. vivax* e proteínas homólogas em *P. falciparum* (PfRh1, PfRh2a, Pfrh2b, PfRh4) (Gaur et al., 2004). Os vários membros das famílias DBL e RBL podem reconhecer diferentes receptores nos eritrócitos, além dos do grupo sanguíneo *Duffy*. Cabe salientar, que estas proteínas que participam do processo de invasão e desenvolvimento do *P. vivax* são potenciais alvos do sistema imune do hospedeiro.

Até o momento, acredita-se que nem todos os receptores localizados nos eritrócitos foram identificados. No entanto, duas vias principais de invasão foram caracterizadas. Ligantes da família EBL, em sua maioria, se ligam a receptores que contém resíduos de ácido siálico, fazendo parte da via de invasão ácido siálico dependente. A família RH, com exceção da RH1, são ácido siálico independente, portanto ligam-se a receptores do eritrócito que não possuem resíduos de ácido siálico. *P. falciparum* utiliza principalmente ácido siálico e glicoforina-A, mas também consegue utilizar vias alternativas para invadir os eritrócitos (Ord et al., 2015).

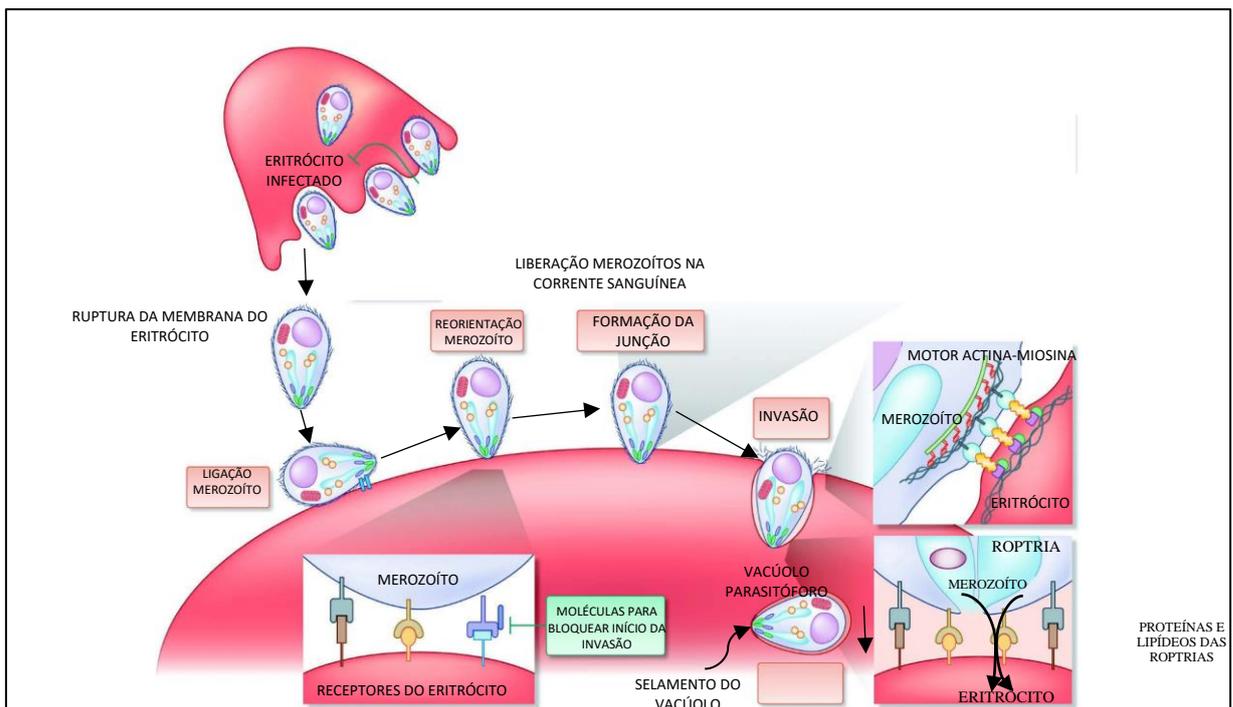


Figura 5. Esquema da invasão do parasito ao eritrócito. O eritrócito infectado se rompe liberando os merozoítos. Na sequência, ocorre a ligação do merozoíto na membrana de um novo eritrócito pelo reconhecimento dos receptores de superfície. O evento é continuado por um processo de reorientação para permitir o contato da porção apical do merozoíto com o eritrócito. Após este contato, uma junção denominada *moving junction* é formada através de interações de alta afinidade com receptores. Esta junção faz com que o parasito, movido pela ação do motor de actina-miosina invada o eritrócito. Neste processo ocorre a formação de um

vacúolo parasitóforo que engloba o parasito no interior da hemácia. FONTE: Adaptado de: (Miller et al., 2013)

1.5 Diversidade Genética

Em estudos de vacinas de subunidades, uma explicação frequente para a eficácia variável da formulação vacinal é a diversidade genética do parasito, que leva à uma resposta imune cepa-específica contra os antígenos parasitários (Figura 6).

Teoricamente, uma cepa de *Plasmodium* pode ser definida como uma variante do parasito que é geneticamente distinta e induz resposta imune específica contra um ou mais antígenos. Porém, no contexto de vacinas de subunidade, o termo cepa refere-se ao isolado a partir do qual o antígeno da vacina é derivado, enquanto a variante genética desse antígeno é conhecida como o alelo ou haplótipo. A inclusão de um único alelo na formulação de uma vacina de subunidade provoca respostas apenas contra alelos semelhantes podendo gerar uma seleção para cepas não vacinais na população vacinada (Mueller et al., 2015).

A expressão de proteínas de *P. vivax* com um alto grau de polimorfismo e as respostas imunes cepa-específicas induzidas por elas, representam um grande obstáculo para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária. Vários estudos têm mostrado uma grande variabilidade genética em proteínas como DBP (Nóbrega de Sousa et al., 2011), MSP-1 (Gutierrez et al., 2000), MSP-5 (Gomez et al., 2006), AMA-1 (Moon et al., 2010). Isto é atribuído, principalmente, à pressão seletiva exercida pelo sistema imune do hospedeiro, que conduz à fixação de variantes na população de parasitos (Moon et al., 2010).

A grande diversidade genética do parasito explica o desenvolvimento lento da imunidade naturalmente adquirida (Bull et al., 1998). Sendo assim, existe a necessidade de exposição repetida ao antígeno, ao longo de vários anos, a fim de gerar um repertório de anticorpos para os diferentes sorotipos que circulam em uma área endêmica (Marsh and Kinyanjui, 2006).

Por outro lado, alguns antígenos de *Plasmodium* sp. são relativamente conservados, tais como RH5 (Hayton et al., 2008), ou têm regiões funcionais altamente conservadas, tais como a região de ligação ao receptor de AMA-1 (Bai et al., 2005; Collins et al., 2009). Dada a alta diversidade dos candidatos vacinais, para obter-se uma vacina eficaz contra a malária, estratégias como uma formulação multivalente e o estudo da diversidade genética, na busca por candidatos pouco polimórficos, tornam-se necessárias.

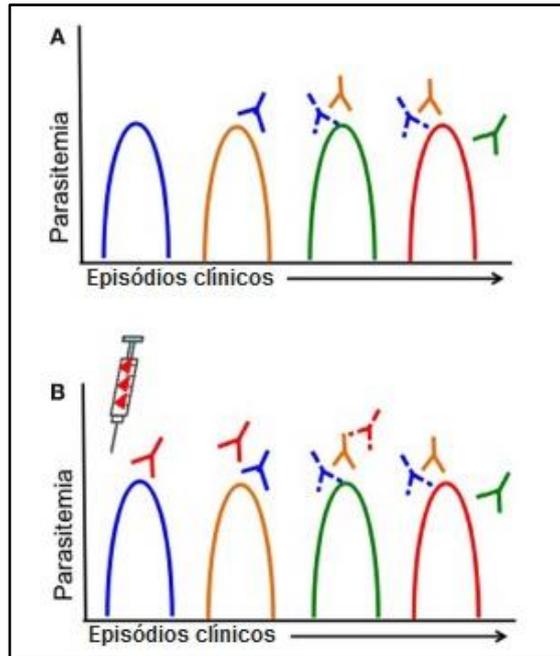


Figura 6. Efeitos da diversidade genética em casos de malária e na eficiência de vacinas. A imagem mostra o impacto da diversidade na infecção natural e na eficácia de vacinas. Os picos de parasitemia correspondem a episódios clínicos diferentes e as cores indicam sorotipos diferentes. Anticorpos cepa-específicos adquiridos são vistos na cor correspondente ao episódio clínico no qual foram adquiridos. As linhas sólidas representam uma reposta imune forte enquanto as linhas tracejadas indicam resposta de anticorpos limitada. (A) Infecção natural com episódios recorrentes de malária em um indivíduo que adquire apenas anticorpos cepa-específicos após a infecção. À medida que os indivíduos entram em contato com cepas diferentes através de infecção natural (ou vacinação), eles adquirem anticorpos cepa-específicos e têm um menor risco de ter um episódio clínico causado pela mesma cepa. (B) Baixa eficácia de uma vacina em um indivíduo devido à diversidade antigênica. A seringa indica vacinação com um único sorotipo (vermelho). Se for administrada uma vacina de cepa única no início, é mais provável que os indivíduos apresentem episódios clínicos devido a outras cepas (azul, amarelo, verde) do que a cepa da vacina, até que as respostas de anticorpos diminuam. Fonte: Adaptado de (Barry and Arnott, 2014).

1.6 Imunidade naturalmente adquirida

A imunidade naturalmente adquirida é a capacidade adquirida pelo hospedeiro de responder de maneira mais eficiente durante uma segunda exposição, ou exposições subsequentes, a um patógeno. Essa resposta possui qualidade e longevidade variáveis. Alguns indivíduos adquirem uma proteção a longo prazo, após um número limitado de exposições, enquanto em outros casos, são necessárias exposições contínuas para a resposta imune protetora ser mantida. Essas duas situações ocorrem em infecções por malária, variando de acordo com o hospedeiro, idade, parasito, tipo de exposição prévia e intensidade de transmissão, sendo esta última relacionada à diversidade genética do parasito (Mueller et al., 2013)

Nas áreas onde a malária é endêmica, os indivíduos são expostos naturalmente à infecção malárica repetidamente, produzindo respostas imunes específicas contra diversas cepas e desenvolvem uma imunidade que permanecerá enquanto se mantiverem na região de transmissão. A imunidade adquirida geralmente é de curta duração e cepa-específica; gradualmente desenvolvida após repetidas infecções (Marsh and Howard, 1986; Marsh and Kinyanjui, 2006; Mueller et al., 2013). Esta imunidade gera a habilidade de conter a parasitemia, oferecendo proteção contra o agravamento dos sintomas e diminuindo a mortalidade. Crianças mais velhas e adultos, quando expostos a infecções frequentes, tornam-se resistentes a morbidade, gravidade e a morte, embora permaneçam suscetíveis à infecção (Marsh and Kinyanjui, 2006)

Embora o sistema imunológico humano ataque quase sempre em qualquer fase do ciclo de vida do parasito, no hospedeiro humano (Hollingdale et al., 1984), a resposta imune naturalmente adquirida é gerada principalmente na fase sanguínea (Mueller et al., 2013).

Na ilha da Nova Guiné, onde *P.falciparum* e *P. vivax* são altamente endêmicos (Muller et al., 2003), *P. vivax* é a fonte predominante de infecções por malária em crianças menores de 2 anos (Senn et al., 2012). Em estudos de coorte em crianças de um a quatro anos de idade (Lin et al., 2010) e 5-14 anos (Michon et al., 2007) foi visto que a incidência de malária por *P. vivax* começou a diminuir a partir do segundo ano de vida, enquanto a incidência de *P. falciparum* continuou a aumentar até o quarto ano (Lin et al., 2010) e aos cinco anos de idade, a maioria das crianças já havia adquirido uma imunidade quase completa para a doença causada por *P.vivax*, mas permaneceu o risco de doença por *P. falciparum*.

A idade do indivíduo durante a primeira exposição à malária pode refletir na aquisição de resposta imune naturalmente adquirida. Estudos envolvendo imigrantes não imunes à Nova Guiné, que foram expostos pela primeira vez a uma transmissão intensa indicaram que os adultos adquiriram imunidade clínica à malária após poucas infecções por *P. falciparum*, ao contrário das crianças que permaneceram suscetíveis após uma exposição comparável (Baird et al. Al., 1991, 2003). Esta relação não foi observada com infecções por *P. vivax*. Isto sugere que pode haver diferenças fundamentais na forma como a imunidade é desenvolvida.

Existem diferenças na aquisição de imunidade contra *P. vivax* e *P. falciparum*. Indivíduos adquirem imunidade ao *P. vivax* mais facilmente do que ao *P. falciparum* (Lin et al., 2010; Michon et al., 2007). Isto ocorre devido a biologia do *P. vivax*. Algumas das características que influenciam diretamente são: 1) Recaídas. Devido a formação de hipnozoítos, a imunidade à fase sanguínea de *P. vivax* pode ser aumentada mesmo quando a transmissão da malária é baixa ou ausente 2) Intensidade de infecções no estágio sanguíneo

aumentada. Exposição mais frequente a novos genótipos devido a uma população maior de *P. vivax* na comunidade. 3) Ligantes essenciais para a invasão dos eritrócitos. De uma maneira geral, *P. vivax* invade reticulócitos apenas e necessitam do receptor antígeno Duffy para ter sucesso na invasão, apenas PvDBP é ligante de Duffy. Indivíduos podem desenvolver resposta imune naturalmente adquirida visando essas vias críticas, ao contrário de *P. falciparum* que possui vias de invasão mais amplas.

1.7 Vacinas contra a malária

Esforços vem sendo realizados a fim de encontrar uma vacina eficiente contra a malária. Porém, devido a vários fatores e características do parasito, a busca por bons candidatos vacinais torna-se um desafio.

A principal dificuldade se refere a biologia do parasito. Devido aos diversos estágios do seu ciclo de vida, o parasito expressa diferentes antígenos estágio-específicos, portanto gera resposta imune específica contra cada um deles. Além disso, os antígenos de superfície estão sob pressão seletiva pela resposta imune do hospedeiro, resultando muitas vezes em diversidade genética (Escalante et al., 1998; Takala and Plowe, 2009). Para selecionar um bom candidato vacinal é necessário avaliar a sua diversidade genética. Antígenos altamente polimórficos podem provocar respostas imunes alelo-específicas, levando a uma proteção com baixa eficiência após a vacinação. Por outro lado, aqueles que se apresentam conservados, são potenciais alvos para serem avaliados como candidatos vacinais (Takala and Plowe, 2009).

As principais características necessárias para a obtenção de uma vacina protetora contra a malária são: 1) Ser eficaz na prevenção da doença, na evolução em formas clínicas graves e transmissão na comunidade; 2) ser completamente segura para crianças, jovens e população de risco; 3) promover proteção contra todas as espécies de *Plasmodium* que infectam o homem; 4) promover imunidade de longa duração; 5) ser administrada nos primeiros meses de vida; 6) ser de fácil fabricação, administração, armazenamento e manipulação; 7) ser acessível para os governos dos países de baixa renda (García-Basteiro et al., 2012).

Os candidatos vacinais podem ser classificados de diversas formas, uma delas é baseada nas fases do ciclo do parasito. Desta forma, classificam-se em candidatos vacinais que atuam na fase pré-eritrocítica, eritrocítica e no bloqueio da transmissão.

Uma vacina pré-eritrocítica efetiva não apenas pode reduzir o número de infecções primárias, mas também impedirá a formação de hipnozoítos, diminuindo o risco de reincidência da doença, em casos de infecção por *P. vivax* (Mueller et al., 2015). Além disso, também é

capaz de gerar um forte impacto na transmissão, visto que causaria uma drástica queda na parasitemia.

As vacinas de estágio sanguíneo têm capacidade de bloquear o desenvolvimento do parasito. Assim, seriam capazes de prevenir a doença e a morte, diminuindo a parasitemia na fase sanguínea e o potencial de transmissão. Por fim, os candidatos que atuam no bloqueio da transmissão impedem a infecção do mosquito vetor e também o ressurgimento da transmissão em áreas onde a doença já foi eliminada (Mueller et al., 2015).

A viabilidade de uma vacina contra a malária é suportada pelo fato de que pessoas que vivem em áreas endêmicas desenvolvem imunidade contra os sintomas da doença. Além disso, alguns estudos realizados mostraram resultados promissores. A transferência passiva de imunoglobulinas de adultos hiperimunes provenientes da África Ocidental para crianças não imunes com malária grave mostrou ter propriedades curativas, o que demonstra que a resposta de anticorpos é importante na proteção contra a doença (COHEN et al., 1961). Alguns estudos demonstraram que ao vacinar primatas com antígenos recombinantes foi gerado um alto título de anticorpos e também mostrou resposta protetora quando realizado desafio (Darko et al., 2005; Dutta et al., 2009; Stowers et al., 2002). Além disso, a vacinação utilizando esporozoítos irradiados, seguida do desafio homólogo e heterólogo, gerou imunidade naturalmente adquirida e imunidade estéril em humanos, sugerindo que uma vacina no combate à malária seja possível (Clyde, 1975; Hoffman et al., 2002).

A principal vacina e a mais eficiente contra malária falciparum, até o momento, é a RTS,S. A RTS,S, é uma vacina baseada em uma proteína recombinante, que consiste na porção C-terminal do gene da CSP de *P. falciparum* fusionada com a porção N-terminal do antígeno de superfície da hepatite B (S). Quando expressa em sistema de *Saccharomyces cerevisiae* o produto fusionado (RTS) se liga ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B (S) não fusionado, formando partículas imunogênicas denominadas RTS,S (Bojang et al., 2001). Esta formulação demonstrou proteção de 30-50% contra a malária falciparum em testes de Fase II e Fase III em crianças (Alonso et al., 2004).

O sucesso de uma vacina contra a malária deve estar relacionado à intervenção contra o desenvolvimento do parasito no hospedeiro humano ou no mosquito vetor. Vários estudos têm sido direcionados para a identificação e caracterização de antígenos de *Plasmodium sp.* que sejam potenciais candidatos a uma vacina contra malária. O desenvolvimento de vacinas antimaláricas tem sido bastante intenso contra a malária causada por *P. falciparum*. Atualmente, 37 candidatos vacinais em fase pré-clínica ou clínica estão sendo testados (Organization, 2016), Porém, quando comparado a *P. falciparum*, poucos estudos têm sido realizados para a obtenção

de uma vacina para *P. vivax*. Isso deve-se, principalmente, à dificuldade em realizar testes *in vitro*, visto que não é possível cultivar o parasito e aos poucos conhecimentos que se tem sobre os seus antígenos.

1.8 Vacinas contra a malária vivax

Esforços vem sendo aplicados ao longo das últimas duas décadas visando o desenvolvimento de vacinas contra diferentes estágios de *P. vivax*. A Tabela 1, traz os principais candidatos vacinais para malária vivax que estão sendo estudados, bem como a fase de desenvolvimento e estágio do ciclo do parasito em que eles atuam.

Tabela 1. Vacinas experimentais contra a malária vivax em desenvolvimento.

Candidatos vacinais	Fase de desenvolvimento	Estágio do ciclo de vida	Antígeno	Referência
VMP001	Fase I/IIa	Hepático	PvCSP	(Bennett et al., 2016; Yadava et al., 2007)
CSV-S,S	Pré-clínica	Hepático	PvCSP	(Vanloubbeeck et al., 2013; Yadava et al., 2014)
PvCSP-LSP	Fase I	Hepático	PvCSP	(Herrera et al., 2005; Herrera et al., 2004; Herrera et al., 2011)
ChAd63-PvTRAP/MVA-PvTRAP	Fase I	Hepático	PvTRAP	(Bauza et al., 2014)
PvDBPII	Pré-clínica	Erítrocítico	PvDBP	(Moreno et al., 2008; Wiley et al., 2011)
PvDBPII-DEK	Pré-clínica	Erítrocítico	PvDBP	(Ntumngia and Adams, 2012)
ChAd63-PvDBPII/MVA-PvDBPII	Pré-clínica	Erítrocítico	PvDBP	(de Cassan et al., 2015)
PvMSP1	Pré-clínica	Erítrocítico	PvMSP1	(Devi et al., 2007; Rosa et al., 2006)
ChAd63-PvAMA1/MVA-PvAMA	Pré-clínica	Erítrocítico	PvAMA1	(Bouillet et al., 2011; Vicentin et al., 2014)
PvAMA1	Pré-clínica	Erítrocítico	PvAMA1	(Vicentin et al., 2014)
Pvs25H	Fase I	Bloqueio de transição	Pvs25	(Malkin et al., 2005; Wu et al., 2008)
Pvs28	Pré-clínica	Bloqueio de transmissão	Pvs28	(Hisaeda et al., 2000)
AnAPN1	Pré-clínica	Bloqueio de transmissão	AnAPN1	(Armistead et al., 2014)

Fonte: Adaptado de (Mueller et al., 2015).

1.8.1 Vacinas pré-eritrocíticas

P. vivax circumsporozoite protein (PvCSP)

Os resultados de proteção parcial contra *P. falciparum* obtidos na imunização utilizando a vacina RTS,S que é baseada na proteína circumsporozoíta (PfCSP), levaram ao estudo da utilização do homólogo PvCSP de *P. vivax*. Foi construída uma proteína quimérica chamada *Vivax malaria protein 1* (VMP001), que possui as regiões amino e carboxi-terminal da CSP e uma região repetitiva que contém sequências repetidas dos parasitos VK210 (tipo 1) e VK247 (tipo 2). VMP001 em combinação com adjuvante AS01B foi testada na fase I/IIa em voluntários. A formulação mostrou-se segura e induziu um título alto de anticorpos. No entanto, a vacina não induziu uma imunidade esterilizante no desafio utilizando esporozoítos de *P. vivax* em nenhum dos voluntários (Bennett et al., 2016).

Outro candidato de fase hepática, o CSV-S,S induziu níveis de anticorpos específicos maiores que os produzidos na administração de VMP001 quando ambos foram aplicados com adjuvante AS01 (Vanloubbeeck et al., 2013). Uma outra combinação contendo VMP001 e CpG10104 + Montanide ISA720 foi testada, foi realizado um desafio utilizando esporozoítos de *P. vivax* em macacos da espécie *Aotus nancymaae*. Foi visto que 66% dos macacos vacinados tiveram resposta protetora (Yadava et al., 2014).

Com base na identificação de epítomos de células B e T no PvCSP, foram desenvolvidos peptídeos sintéticos longos (LSPs), N (N-terminal), R (repetitivo) e C (carboxi-terminal) para avaliação como candidatos vacinais (Herrera et al., 2004). Os três foram testados em Fase I, separadamente, com Montanide ISA720 em diferentes doses (10ug/dose, 30ug/dose e 100ug/dose) (Herrera et al., 2005). Além disso, os três foram testados juntos em concentrações de 50ug/dose e 100ug/dose de peptídeos com Montanide ISA 720 e Montanide ISA 51. Foram produzidos anticorpos contra cada peptídeo da mistura que reconheceram a proteína PfCSP nativa na superfície do esporozoíto (Herrera et al., 2011).

P. vivax thrombospondin related adhesive protein (PvTRAP)

Bauza e colaboradores utilizaram a proteína PvTRAP (*thrombospondin-related adhesive protein*). A proteína foi expressa utilizando o adenovírus de chimpanzé ChAd63 e MVA (*modified vaccinia virus Ankara*). Quando administrada uma dose de ChAd63 recombinante

expressando PvTRAP seguida por um *boost* com MVA recombinante expressando PvTRAP foi obtido um título alto de anticorpos e resposta de células T em camundongos.

Neste mesmo estudo, foi usado *Plasmodium berghei* transgênico infeccioso, expressando TRAP de *P. vivax* o que permitiu estudos da eficácia da vacina e mecanismos de proteção em roedores. Utilizando este modelo, verificou-se que tanto as células T CD8 + como os anticorpos mediam a proteção contra a malária utilizando vacinas vectorizadas por vírus.

Portanto, ChAd63 e MVA que expressam PvTRAP são candidatos a vacinas pré-eritrocíticas com potencial para aplicação clínica (Bauza et al., 2014).

1.8.2 Vacinas de estágio sanguíneo

P. vivax merozoite surface proteins (MSP-1)

Merozoite Surface Protein 1 (MSP-1) é uma proteína expressa na superfície do merozoíto e está envolvida nas respostas imunes humoral naturalmente adquirida e celular. Através de processos proteolíticos, são produzidos fragmentos menores (83, 30, 38 e 42kDa) a partir da proteína inteira (~195kDa). O fragmento de 42kDa é posteriormente clivado em dois outros fragmentos C-terminais (33kDa e 19kDa). Estudos realizados em *Macaca sinica* utilizando MSP-1₄₂ e MSP-1₁₉ de *Plasmodium cynomolgi* mostraram que estes dois fragmentos são imunogênicos e geraram uma proteção no desafio utilizando *P. cynomolgi* (Perera et al., 1998).

PvMSP-1₁₉ recombinante foi testado em combinação com PvDBPII, administrado com adjuvante Montanide ISA 720. Esta formulação gerou um título alto de anticorpos contra ambos os antígenos em camundongos (Devi et al., 2007). Esta mesma proteína foi fusionada com dois epítomos de células T auxiliares de MSP-1 e a imunogenicidade foi avaliada em *Callithrix jacchus jacchus*. Quando testada com adjuvante completo de Freund foi visualizada uma resposta imune alta, porém quando administrada com outros adjuvantes os títulos de anticorpos foram baixos (Rosa et al., 2006).

Um outro estudo avaliou a resposta imune, contra a porção N-terminal de Pv-MSP1, de indivíduos residentes em Rio Pardo (Amazonas, Brasil). Foi visualizado um alto título de anticorpos contra os blocos conservados 2-5 de PvMSP1 (PvMSP1 ICB2-5). Além disso, os valores de IgG total anti-ICB2-5 foi detectado como um importante fator de proteção contra novos surtos de malária vivax na análise de sobrevivência em uma pesquisa prospectiva, o que

sugere que outras regiões de PvMSP1 podem ser consideradas bons candidatos vacinais (Versiani et al., 2013).

Receptor-binding region II de P. vivax Duffy binding protein (PvDBPII)

PvDBP é uma proteína, produzida pelo micronema, que se liga aos antígenos do grupo *Duffy* em reticulócitos humanos no processo de invasão do eritrócito por merozoítos de *P. vivax* (Chitnis and Sharma, 2008). A proteína de ligação de Duffy é considerada um dos principais candidatos vacinais do estágio sanguíneo de *P. vivax*. Uma vez que possui uma função vital para o parasito no processo de invasão do eritrócito.

Uma região conservada, de 330 resíduos de aminoácidos, rica em cisteína denominada como região II (PvDBPII), dentro da PvDBP, medeia a ligação com o antígeno *Duffy* (Chitnis and Miller, 1994). O bloqueio desta interação receptor-ligante com anticorpos induzidos contra PvDBPII oferece um potencial mecanismo para bloqueio da invasão (Grimberg et al., 2007) e prevenção contra a malária vivax.

Em um estudo realizado com crianças, em uma região endêmica na Papua Nova Guiné, foi visto que os títulos de anticorpos naturalmente adquiridos anti-PvDBPII estão associados com proteção contra infecções por *P. vivax* (King et al., 2008).

Foi avaliada a imunogenicidade da proteína recombinante PvDBPII. Para isso, macacos *rhesus* foram imunizados com PvDBPII com adjuvantes Alhydrogel, Montanide ISA720 e AS02A e foi visualizado um alto título de anticorpos (Moreno et al., 2008).

O domínio ligante da DBP (DBPII) é polimórfico, mostrando uma diversidade que gera pressão imunológica seletiva, o que tende a comprometer a eficácia da vacina. Estudos mostraram que uma região polimórfica de DBPII é um epítipo de célula B, alvo de anticorpos humanos anti-DBP, este epítipo é chamado DEK. Existe a hipótese que os resíduos polimórficos, que não são funcionalmente importantes para a ligação de eritrócitos, mas flanqueiam o motivo de ligação ao receptor de DBPII, compreendem epítipos variantes que tendem a desviar a resposta imunitária para longe de epítipos mais conservados.

Um alelo artificial de DBPII (nomeado DEKnull) foi expresso e avaliado quanto a sua imunogenicidade O antígeno DEKnull impediu a atividade de ligação ao eritrócito e gerou um título alto de anticorpos em ratos imunizados com a proteína a recombinante DEKnull. (Ntumngia and Adams, 2012).

P. vivax apical merozoite antigen 1 (PvAMA1)

Recentemente foi realizado um estudo utilizando adenovírus e proteína recombinante em diferentes regimes de *prime-boost* para estudar a imunogenicidade de AMA1. O grupo que combinava a proteína com adjuvante Montanide ISA 720 seguido de Ad5PvAMA1 resultou na produção de anticorpos específicos contra PvAMA1 assim como resposta de célula T de memória (Bouillet et al., 2011).

Em outro estudo PvAMA1 foi expresso em *Pichia pastoris* onde imunizações utilizando adjuvantes QuilA e adjuvante incompleto de Freund geraram títulos altos de anticorpos quando comparado a utilização de *monophosphoryl lipid A* (MPLA) ou *Alum plus MPLA*. Além disso, PvAMA-1 gerou anticorpos inibidores da invasão contra diversas cepas de *P. vivax* (Vicentin et al., 2014).

1.8.3 Vacinas de bloqueio da transmissão

Pvs25 e Pvs28

Pvs25 e Pvs28 são proteínas expressas na superfície do zigoto e oocineto. Estas foram expressas recombinantes em *Saccharomyces cerevisiae* e com a adição de adjuvante Alhydrogel provocou a produção de anticorpos em camundongos e inibiu o desenvolvimento do parasito no mosquito (Hisaeda et al., 2000).

A imunogenicidade da proteína Pv25 foi testada utilizando aos adjuvantes Montanide ISA720 e Alhydrogel em macaco *rhesus*. A formulação contendo adjuvante Montanide ISA720 provocou produção de anticorpos com título 10 vezes maior e com uma alta atividade de bloqueio de transmissão em comparação com o grupo Alhydrogel (Saul et al., 2007). Pvs25H, uma formulação contendo Pvs25 com Alhydrogel foi testada com doses contendo 5, 20 e 80µg em testes de fase I em voluntários saudáveis (Malkin et al., 2005). Essa formulação mostrou-se segura e induziu um alto título de anticorpos. No entanto, apresentou apenas 20-30% de redução no número de mosquitos infectados, em ensaios experimentais utilizando membrana sintética com soros de indivíduos imunizados.

Apesar dos resultados obtidos, são necessários níveis mais elevados na atividade de bloqueio de transmissão para comprovar a eficácia da vacina.

AnAPN1

Alanil aminopeptidase 1 (*AnAPN1*) é um antígeno de superfície conservado presente na membrana do intestino médio de *Anopheles*. Este é essencial para a invasão e desenvolvimento do oocineto. Foi observado que anticorpos contra *AnAPN1* tem atividade de bloqueio na transmissão contra *P. vivax* e *P. falciparum* em espécies divergentes de anofelinos, o que dá suporte ao desenvolvimento a uma vacina baseada neste antígeno (Armistead et al., 2014).

1.9 O antígeno MAEBL

Kappe e seus colaboradores (Kappe et al., 1998) foram capazes de isolar e identificar um antígeno de aproximadamente 200 kDa de *Plasmodium yoelii* e *P. berghei* como parte integrante da família de proteínas de ligação do parasito ao eritrócito (EBP). Este antígeno denominado MAEBL possui domínios de duas famílias proteicas presentes em organelas situadas na região apical de merozoítos e relacionadas com a infectividade do parasito (Blackman and Bannister, 2001; Noe and Adams, 1998; Preiser et al., 2000). A sua região carboxi-terminal possui homologia estrutural com as proteínas *Duffy Binding Like* (DBL), enquanto sua porção amino-terminal, rica em cisteínas, apresenta similaridade com o domínio de 44 kDa do antígeno apical de membrana 1 (AMA-1). A similaridade de cada região deste antígeno a duas proteínas distintas confere um caráter quimérico a esta molécula (Figura 7).

O gene *maebl* de *P. yoelii* e *P. berghei* é composto de uma única cópia e possui uma estrutura de vários éxons, cada um representando um domínio funcional. Tal qual o antígeno MAEBL expresso em *P. yoelii* e *P. berghei*, o seu correspondente expresso em *P. falciparum* também apresenta atividade adesiva mediada principalmente pela região M2 (Ghai et al., 2002). Mais ainda, soro de pacientes provenientes de regiões endêmicas foi capaz de reconhecer uma proteína recombinante baseada na porção M2 de *P. falciparum*.

Os domínios M1 e M2 do antígeno MAEBL de *P. yoelii* são responsáveis pela ligação desta molécula a eritrócitos, esta propriedade adesiva é similar àquela observada pelos antígenos DBL de *P. vivax*, *P. knowlesi* e *P. falciparum* (Adams et al., 2001). Os motivos presentes no antígeno MAEBL de *P. falciparum* que apresentam esta capacidade adesiva foram recentemente descobertos utilizando peptídeos correspondentes a diferentes porções dos domínios M1 e M2 (Ocampo et al., 2004). Neste trabalho, foi demonstrada a capacidade de

alguns destes peptídeos em inibir a invasão de merozoítos de *P. falciparum*, e a existência de dois motivos de adesão no domínio M1 e cinco no domínio M2. Estes resultados sugerem o domínio M2 como o principal responsável pela capacidade adesiva da molécula.

Também foi mostrado que o gene *maebl* de *P. falciparum* possui maior similaridade com seu correspondente em *P. yoelii* e *P. berghei*, do que com os genes *pfama1* ou *eba175* também de *P. falciparum* (Ghai et al., 2002). Além disto, este estudo mostrou que; tal qual no antígeno MAEBL expresso em *P. yoelii* e *P. berghei*, o seu correspondente expresso em *P. falciparum* também apresenta atividade adesiva, mediada principalmente pela região M2. Ainda neste trabalho, foi observado que o soro de pacientes provenientes de regiões endêmicas foi capaz de reconhecer uma proteína recombinante (r-PfM2), baseada na porção M2 do MAEBL, de *P. falciparum* e inibir a adesão da r-PfM2 a eritrócitos.

Apesar do antígeno MAEBL ter sido descrito primeiramente em merozoítos sanguíneos, a produção desta molécula também foi observada em esporozoítas de *P. yoelii*, *P. berghei* e *P. falciparum* coletados a partir de glândulas salivares de mosquitos infectados (Ghai et al., 2002; Kappe et al., 2001; Kariu et al., 2002). Em experimentos de depleção gênica foi mostrado que MAEBL é essencial para a infecção dos esporozoítos nas glândulas salivares do mosquito vetor, mas não é essencial para a invasão do merozoíto nos eritrócitos. O que leva a conclusão que MAEBL é produzido pelos esporozoítos nos oocistos e que esta proteína está implicada na migração do esporozoíto na glândula salivar (Kariu et al., 2002).

Preiser e colaboradores (Preiser et al., 2004) mostraram que MAEBL é expresso de maneira diferenciada em esporozoítos da glândula salivar e esporozoítos presentes no intestino do inseto. Além disto, estes autores demonstram que anticorpos capazes de reconhecer o antígeno MAEBL de *P. yoelii*, também inibem o desenvolvimento do parasito em culturas primárias de hepatócitos infectados por esporozoítos. Estes dados sugerem fortemente a participação desta proteína no desenvolvimento do estágio hepático no hospedeiro vertebrado e abrem perspectivas para sua utilização como alvo de uma resposta imune mais abrangente e eficaz.

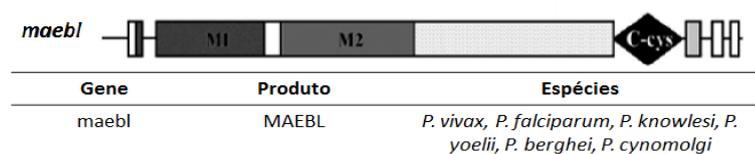


Figura 7. Estrutura do gene *maeb1*, produto e espécies que possuem o gene. Na porção N-terminal estão presentes os domínios ricos em cisteína M1 e M2 homólogos a domínios de AMA1 e na porção C-terminal um domínio rico em cisteína homólogo ao encontrado nas proteínas DBL. Adaptado de (Michon et al., 2002).

1.10 O antígeno RON2

O antígeno RON2 (*Rhoptry Neck Protein*) de *Plasmodium vivax* foi identificado pela primeira vez por Arévalo-Pinzón e colaboradores. PvRON2 possui uma estrutura de 2204 resíduos de aminoácidos, codificada por um único éxon de 6.615pb. Possui uma sequência sinal hidrofóbica putativa na porção N-terminal e um domínio transmembrana na região C-terminal entre os resíduos de aminoácido 2,087-2,109. É conservada no filo Apicomplexa, expressa em esquizontes tardios e secretada por organelas denominadas roptrias nos merozoítos (Arévalo-Pinzón et al., 2011). Foi comprovado em *Toxoplasma gondii* que a proteína TgAMA1 forma um complexo com as proteínas TgRON2, TgRON4 e TgRON5 durante a invasão do eritrócito (Alexander et al., 2005; Boothroyd and Dubremetz, 2008; Lebrun et al., 2005) (Figura 8). Além disso, em *P. falciparum* foi visto que PfRON4 está associado a PfAMA-1 (Alexander et al., 2006). PvRON2 é homóloga à RON2 presente em *P. falciparum*, que interage com PfAMA-1 no processo de invasão ao eritrócito. Portanto, sugere-se que em *P. vivax*, PvRON2 exerce a mesma interação (Cao et al., 2009).

AMA1 se liga à RON2 e à outras proteínas RON, estabelecendo a estrutura “*moving junction*” que faz uma conexão entre o merozoíto e o eritrócito. O merozoíto se move da região anterior para a posterior através desta estrutura, este movimento que proporciona a entrada do parasito no eritrócito é impulsionado pelo motor de actina e miosina. Essa interação não está completamente elucidada e ainda existem divergências a respeito do papel de cada molécula durante a invasão. No entanto, foi comprovado que em *P.falciparum*, a inibição na interação do complexo AMA1-RON2 desfaz a ligação, interrompendo a invasão do eritrócito (Giovannini et al., 2011; Srinivasan et al., 2013; Tonkin et al., 2011). Além disso, foi visto que dois peptídeos, R1 e F1 atuam bloqueando a interação entre PfAMA1 e o complexo de RONs, inibindo o processo de invasão o que também foi visualizado com a ação do anticorpo 4G2 (Collins et al., 2009).

Devido a conservação da proteína RON2 em diferentes espécies de *Plasmodium* e ao papel fundamental do complexo RON2-AMA1 na invasão da célula hospedeira, o antígeno RON2 mostra-se essencial neste processo, sendo um possível alvo do sistema imune do hospedeiro, portanto, torna-se importante o estudo da diversidade e imunogenicidade deste antígeno, visando e o seu potencial como candidato vacinal.

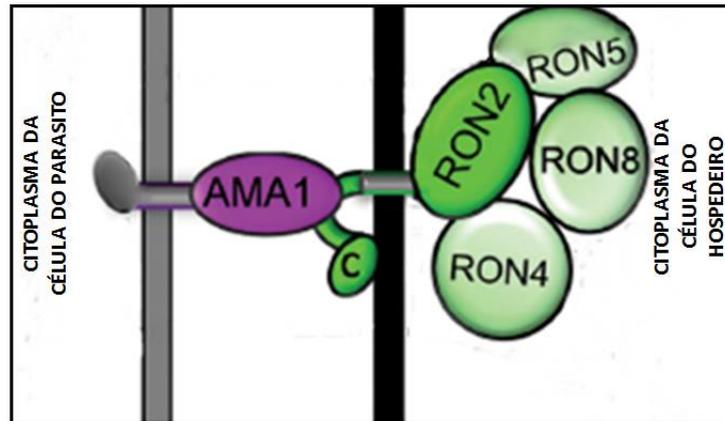


Figura 8. Formação do complexo das proteínas AMA1 com RON2, RON4, RON5 e RON8 durante o processo de invasão do eritrócito. A proteína AMA1 forma um complexo com as proteínas RON, que se inserem no citoplasma da célula hospedeira, possibilitando a invasão do eritrócito. Adaptado de (Tonkin et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a diversidade genética e a imunogenicidade dos candidatos vacinais MAEBL e RON2 de isolados de *Plasmodium vivax* provenientes do Brasil

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a diversidade genética dos genes codificadores de MAEBL e de RON2 de isolados de *P. vivax* coletados em Manaus, Mâncio Lima e Acrelândia;
- Determinar a distribuição dos SNPs e dos resíduos de aminoácidos sob pressão seletiva na estrutura tridimensional de PvMAEBL e PvRON2;
- Comparar os polimorfismos das sequências dos isolados brasileiros com sequências públicas;
- Clonar e expressar MAEBL e RON2 recombinantes em sistema de expressão heterólogo bacteriano;
- Avaliar a capacidade de interação das proteínas recombinantes de MAEBL e RON2 ao eritrócito;
- Avaliar a imunogenicidade dos antígenos MAEBL e RON2 utilizando um painel de plasmas de pacientes infectados com *P. vivax* na Amazônia Brasileira.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas de Coleta das Amostras de *Plasmodium vivax*

Os isolados de *P. vivax* foram coletados no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2014 na cidade de Manaus, capital do estado do Amazonas, e no estado do Acre nos municípios de Mâncio Lima e Acrelândia, no período entre 2013 e 2014.

3.2 Amostras

As amostras provenientes de Manaus, foram coletadas na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Todas estas amostras foram coletadas de indivíduos diagnósticos por gota espessa com malária vivax, tendo estes indivíduos idade entre 18 e 60 anos. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sendo este aprovado pelo comitê de ética sob o número CAAE-0044.0.114.000-11. O sangue coletado foi centrifugado para a obtenção do plasma, que foi estocado em microtubo e mantido a -20°C.

As amostras de Mâncio Lima e Acrelândia foram coletadas e processadas pelo grupo de pesquisa do Professor Dr. Marcelo Urbano Ferreira, do Laboratório de Parasitologia Experimental e Aplicada na Universidade de São Paulo (USP) que, gentilmente, cedeu as amostras de DNA para serem realizadas as análises de diversidade genética.

3.3 Extração de DNA

O DNA genômico dos isolados de Acrelândia e Mâncio Lima foram extraídos utilizando o kit QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (Qiagen) segundo instruções do fabricante.

Para os isolados de Manaus, a extração de DNA foi realizada seguindo o seguinte protocolo: Foi adicionado a um *pellet* de aproximadamente 200ul de sangue 10-20 volumes (v) de PBS 1x e em seguida foi adicionado saponina 0,1%. O *pellet* foi homogeneizado e após 10 minutos de incubação a 37°C, foi realizada uma centrifugação a 4000rpm por 5 min a temperatura ambiente (TA). O precipitado foi ressuspenso em 250µl de TE e 200µl de tampão de lise 2x (contendo 10 mg/ml de Proteinase K). A incubação foi realizada a 37 °C por 3 horas ou *overnight*. Após, foram adicionados 1v de fenol, sendo o tubo mantido sob agitação branda

por 5 min a TA e depois centrifugado por 5 min a 6000rpm, a TA. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e a esta foram adicionados 1v de fenol/clorofórmio. Após nova agitação e centrifugação, o sobrenadante foi coletado. Foi aplicado RNase seguido de uma incubação a TA por 30 min, posteriormente foi adicionado clorofórmio. Outra centrifugação foi realizada, fase aquosa foi transferida para outro tubo e foi adicionado 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2,5v de etanol 100%. Os tubos foram mantidos a 4°C por *overnight* para a precipitação do DNA. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O precipitado de DNA foi lavado com 500µl de etanol 70% e centrifugado (5000 x g, 5 minutos, TA). Na sequência, o pellet de DNA foi ressuspensionado em 50µl de TE.

3.4 Diagnóstico molecular por Nested-PCR

A partir do DNA genômico foi realizado o diagnóstico molecular por Nested-PCR (Snounou and Singh, 2002), a fim de eliminar amostras com infecção mista. Este protocolo utiliza oligonucleotídeos específicos da região da subunidade menor do RNA ribossomal, cuja primeira reação de PCR (Reação em cadeia da polimerase) é utilizada para a identificação do gênero *Plasmodium*. A segunda reação é realizada para a identificação das espécies *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malarie* e *P. ovale*, neste caso foram realizadas apenas as reações para identificação de *P. vivax* e *P. falciparum*, visto que as outras espécies não são comuns das regiões onde foram realizadas as coletas. A tabela 2 mostra os oligonucleotídeos utilizados na reação, bem como a espécie alvo na amplificação e o tamanho do fragmento gerado. As amostras que mostraram ser positivas, apenas para *P. vivax*, foram utilizadas.

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos e tamanhos dos fragmentos amplificados na reação de Nested-PCR.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'– 3')	Alvo	Tamanho do fragmento (pb)
PLU5 (F)	CCTGTTGTTGCCTTAACTTC	<i>Plasmodium sp.</i>	1.200
PLU6 (R)	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG		
VIV1 (F)	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	<i>P. vivax</i>	120
VIV2 (R)	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA		

FAL1 (F)	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	<i>P. falciparum</i>	205
FAL2 (R)	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC		

Fonte: Adaptado de (Snounou and Singh, 2002).

3.5 Amplificação dos genes de interesse

3.5.1 Amplificação do gene *maebl* (2.011-3.264nt) de *P. vivax*

A sequência referente ao domínio M2 de *maebl* (2.011-3.264nt) tem como característica uma grande quantidade de bases adenina e timina. Devido a essa característica, houve uma grande dificuldade de obtenção do produto da amplificação da sequência. Várias estratégias de amplificação foram utilizadas a fim de contornar este problema.

Para a obtenção de um fragmento de 1254pb, correspondente a este domínio, inicialmente utilizou-se o protocolo descrito por (Michon et al., 2002) (Tabela 3), além desta foram desenhadas outras duas estratégias (Tabelas 4 e 5).

Além disso, foram testadas variadas temperaturas de anelamento, bem como dois tipos de enzimas DNA polimerase: Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e *Phusion DNA Polymerases* (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados no teste de amplificação de *Pvmaebl* (2.011-3.264nt).

Óligos M2-MAEBL (Michon et al., 2002)	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')
M2 MAEBL F	AATCCTCAAGCCGAATATATGGATAGGTTTGATAT
M2 MAEBL R	CTTTTATTTATAAGACTTTTGCATTTTCC

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados no teste de expressão de *Pvmaebl* (2.011-3.264nt) por Nested-PCR.

Óligos Nested-PCR	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')
M2 MAEBL 1F	GACAAATCCTCAAGCTAAATTTATG
M2 MAEBL 1R	TGTCATTTGTCGTGA GAGATGTG
M2 MAEBL 2F	TCCAAGAAATCACATTTTTATCGATTG
M2 MAEBL 2R	AATGGTCCTCTTTGTGGATGAC

O protocolo que obteve sucesso na amplificação do domínio m2, visando o sequenciamento completo desta região, foi obtido através do desenho de três pares de oligonucleotídeos a fim de realizar três amplificações por PCR de cada amostra, dividindo o gene em três fragmentos que se sobrepõem. Na Tabela 5, encontram-se as sequências dos oligonucleotídeos utilizados nestas reações. A reação utilizada para amplificar os fragmentos 1 e 3 foram realizadas utilizando *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen). As condições de temperatura utilizadas foram as seguintes: 1 ciclo de 5min a 95°C e 35 ciclos de 30s a 95°C, 45s a 58°C, 1min a 72°C e um ciclo final de 5min a 72°C. O fragmento 2 foi amplificado utilizando *Phusion DNA Polymerases* (Thermo Fisher Scientific) nas seguintes condições: 1 ciclo de 5min a 98°C e 35 ciclos de 15s a 98°C, 30s a 59°C, 1min a 72°C e um ciclo final de 10min a 72°C. A observação do resultado da amplificação foi realizada pela visualização da banda correspondente em transiluminador ultravioleta. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese (80V) em gel de agarose 1% corado com SybrSafe (Invitrogen) na diluição de 10.000x

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento do gene *Pvmaebl* (2.011-3.264nt) de *P. vivax*.

Fragmento	Posição(nt)*	Oligonucleotídeo	Sequência (5-3')
1	1.778 - 2.350	PvM2-F1	CCATGCAAAAGAGTGACGAG
		PvM2-R1	GTTTCGATACTGCGTCCGTTT
2	2.011 - 3.264	PvM2-R1	AGATCTAATCCTCAAGCTAAATTTATG
		PvM2-R2	ATTTGTCGTGAGAGATGTGAA
3	3.106 - 3.457	PvM2-F3	GTGATGCTGGCAAATACTGG
		PvM2-R3	CCTCTGTTGCACTACCGTCA

*As posições dos oligonucleotídeos são baseadas na sequência de *maebl* de *Plasmodium vivax*, cepa Sal-1 (PVX092975) disponível no PlasmoDB.

3.5.2 Amplificação de *Pvron2*

A proteína RON2 é codificada por 6,6kb. Por ser uma sequência extensa, optou-se por selecionar uma região para ser analisada. A partir da sequência completa foi escolhido um fragmento de 759pb. Para isso, utilizou-se a sequência Sal-1 (PVX117880) para análise, a fim de escolher uma região da sequência a ser estudada. Utilizou-se o programa *Immune Epitope database and Analysis Resource (IEDB Analysis Resource)* para predição de determinantes antigênicos. Foi levado em consideração, o trecho da sequência que apresentou os melhores resultados, segundo o método de Kolaskar and Tongaonkar (Kolaskar and Tongaonkar, 1990).

Para tornar possível o sequenciamento completo desta região, foram realizadas três PCR a fim de amplificar três fragmentos que se sobrepõem, utilizando os oligonucleotídeos listados na Tabela 6. As condições de temperatura utilizadas nas amplificações dos fragmentos 1 e 3 foram as seguintes: 1 ciclo de 5min a 95°C e 35 ciclos de 30s a 95°C, 45s a 60°C, 1min a 72°C e um ciclo final de 5min a 72°C e as seguintes condições para a amplificação do fragmento 2: 1 ciclo de 5min a 94°C e 35 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C, 45s a 72°C e um ciclo final de 5min a 72°C.

Tabela 6. Oligonucleotídeos utilizados na amplificação da sequência do gene *ron2*(5482-6240nt) de *P. vivax*

Fragmento	Posição (nt)*	Oligonucleotídeo	Sequência (5-3')
1	5.261-5.855	PvRON2-F1	CAGAACGGTCAAGCCAAC
		PvRON2-R1	CGATTTGGGTAGCAGCACAT
2	5.482-6.240	PvRON2-F2	GCCTTCATCGAAATTGTAGACC
		PvRON2-R2	CATGCAAGCTTGTGTGGAG
3	5.868-6.408	PvRON2-F3	GAAGGCCATGAAAAATGGAG
		PvRON2-R3	GGACAAAAATTTCTCCACATG

*As posições dos oligonucleotídeos são baseadas na sequência de *ron2* de *Plasmodium vivax*, cepa Sal-1 (PVX117880) disponível no PlasmoDB.

3.6 Purificação dos Produtos de PCR

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o *kit GeneJET Gel Extraction e DNA Cleanup Micro Kit* (Thermo Scientific), conforme as instruções do fabricante.

3.7 Sequenciamento Automatizado

Os fragmentos de PCR obtidos foram sequenciados por meio do sequenciamento das duas fitas de DNA utilizando *BigDye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit* (PerkinElmer, MA, USA), em um volume final de 6µl, contendo 200-300ng de DNA, 5 pmol de oligonucleotídeo *sense* e/ou *antisense*, 4 µl de *Big Dye Mix*. As reações foram submetidas a 25 ciclos de: 10s a 96°C, 5s a 50°C e 4 min a 60°C. Após a reação de *Cycle Sequencing*, as amostras foram precipitadas com isopropanol 75%, lavadas com etanol 70%, ressuspensas em formamida e aplicadas em um sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems, CA, USA) na plataforma LACTAD, na UNICAMP.

3.8 Análise dos Eletroferogramas

Após a obtenção dos eletroferogramas, cada um destes foi submetido à análise de *base-calling* pelo programa *Phred* (Ewing et al., 1998). Os arquivos contendo as sequências e suas respectivas medidas de qualidade foram analisadas no programa *pregap4* presente no *Staden Package* (Staden et al., 2000). Foram construídos os *clusters*, alinhamentos de sequências com alta similaridade, agrupadas e representadas por uma única sequência consenso (também representada pelo *contig*). A leitura dos eletroferogramas sob as condições citadas acima gerou um banco de dados, com arquivos ZTR, EXP (*experiment files*) e SCF (relativos aos eletroferogramas) para a posterior interpretação dos resultados obtidos no *software gap4*, também constituinte do *Staden Package*. Após a análise das sequências com o programa *gap4*, através da ferramenta *View > Find Internal Joins*, é possível verificar e corrigir possíveis erros no alinhamento das sequências, fundindo dois *clusters* formados por sequências muito similares (máximo de 10% de *Mismatch*). As sequências foram então editadas manualmente por comparação de complementaridade dos *contigs*. Parte das sequências foi montada utilizando o programa *CodonCode Aligner v. 6.0.2.*, que gerou uma sequência consensus a partir das 6 sequências originais de cada amostra.

Todas as sequências geradas através da edição manual no programa *Staden Package e CodonCode Aligner* foram submetidas a análises de controle de qualidade. Esta análise foi realizada através da ferramenta BLAST que testa as sequências para possível existência de contaminações com um banco de dados público no *GenBank*.

3.9 Alinhamento e identificação de polimorfismos

Os polimorfismos de base única (SNPs) foram identificados a partir do alinhamento das sequências de MAEBL-M2 utilizando o programa *ClustalX*. Também foi utilizado o programa *CodonCode Aligner v. 6.0.2* e *MEGA7.0* para a análise dos polimorfismos.

As sequências do domínio M2 de MAEBL foram submetidas ao Genbank e estão depositadas sob os números de acesso: KX061004.1; KX061005.1; KX061006.1; KX061007.1; KX061008.1; KX061009.1; KX061010.1; KX061011.1; KX061012.1. Estas sequências foram alinhadas com 72 sequências depositadas no PlasmDB, provenientes de isolados da Tailândia, Peru, China, México, Coreia do Norte, Brasil e Colômbia (Tabela S1) e comparadas à sequência de referência PvMAEBL Sal-1 (PVX092975).

As 36 sequências de RON2(1828-2080aa) do Brasil estão em processo de submissão ao Genbank. Estas foram alinhadas à 104 sequências de isolados Tailândia, Peru, China, México, Coréia do Norte, Brasil e Colômbia (Tabela S2) e comparadas à sequência de referência Pv-RON2 Sal-1 (Acesso PlasmoDB: PVX117880).

3.10 Clonagem e Transformação de *pvmaebl* e *pvron2*

Foi realizada a otimização dos códons referentes às sequências dos genes *maebl-m2* (2.011-3.264nt) e *ron2* (5482-6240nt). Os genes foram sintetizados pela empresa GenScript (Nova Jersey-EUA), clonados em pGEX 4T-1 e foram adicionadas sequências referentes aos sítios de restrição para as enzimas BamHI-EcoRI e NotI na sequência de *ron2* e BamHI e NotI foram adicionados à sequência do domínio M2 de *maebl*, ambos foram sintetizados e foi enviado 4 μ g de cada plasmídeo liofilizado.

Os plasmídeos foram ressuspensos em 20 μ l de água deionizada estéril. Estes foram transformadas quatro cepas distintas de *E.coli* cálcio-competentes, sendo estas Arctic Express (DE3), BL21 (DE3) Star, BL21 (DE3) PlysS e Rosetta-gami. Para isso, foi utilizado 0,5 μ L de plasmídeo contendo cada um dos genes de interesse e a transformação foi realizada por choque térmico. Foi adicionado 0,5 μ L da ligação em uma alíquota de 50 μ L da bactéria. O tubo foi mantido no gelo por 30min. Para a realização do choque térmico, o tubo foi transferido rapidamente para o banho-maria, a 42°C, onde permaneceu por 1min. Após esse tempo, foi novamente transferido, rapidamente, para o gelo, onde permaneceu por 2min. Após esses procedimentos, foi adicionado 1ml de LB aquecido a 37°C a cada tubo e incubado por 1h a 37°C. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 3000xg por 5min e foram semeados 100 μ L do cultivo de bactérias em uma placa de LB sólido acrescido dos antibióticos necessários para cada cepa.

3.11 Expressão das proteínas recombinantes

3.11.1 Teste de expressão em sistemas de expressão heterólogos bacterianos

Inicialmente foi realizado um teste de expressão para as proteínas recombinantes MAEBL-M2 e RON2 utilizando-se diferentes cepas de *E. coli* (Arctic Express (DE3), BL21 (DE3) Star, BL21 (DE3) PlysS e Rosetta-gami). Para isso, foram feitos pré-inóculos de 2ml

incubados a 37°C *overnight*. No dia seguinte, foram feitos inóculos de 20ml a partir de cada pré-inóculo. Cada gene foi expresso em quatro cepas diferentes e foram testadas 3 temperaturas de indução diferentes para cada uma das cepas durante 4h, exceto para Arctic Express (DE3) que foi testada apenas com a temperatura de 12°C com indução *overnight*, segundo o manual do fabricante. Para cada temperatura, o cultivo foi induzido a uma D.O. específica (Tabela 7). Todas foram induzidas com 1mM de IPTG. Após o tempo de indução, cada cultivo foi centrifugado por 10min a 6.000xg. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de bactéria foi congelado a -20°C. No dia seguinte, o *pellet* foi ressuscitado utilizando 5ml de Tampão de Lise acrescido de coquetel inibidor de protease 1x (inibidor de serina, cisteína, metaloproteases, calpaínas) e incubado por 30min no gelo. Após este tempo, as células foram lisadas por sonicação (2 pulsos de 15seg cada com intervalos de 30seg entre eles). O lisado foi centrifugado por 30min a 10000 x g e o sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e o pellet (fração insolúvel) foi ressuscitado em solução de lise. Estas duas frações foram submetidas a uma corrida em gel de SDS-PAGE em dois géis de poliacrilamida. Um deles foi corado com *Coomassie blue* e outro foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Foi realizado um *Western blotting* (WB) para confirmação da expressão das proteínas desejadas.

Tabela 7. Condições testadas na expressão de proteínas recombinantes.

D.O	Temperatura de indução	Tempo de indução	Cepa
0,7-0,8	25°C	4 horas	BL21 (DE3) Star, BL21 (DE3) PlyS e Rosetta-Gami
0,8-0,9	30°C	4 horas	BL21 (DE3) Star, BL21 (DE3) PlyS e Rosetta-Gami
0,9-1	37°C	4 horas	BL21 (DE3) Star, BL21 (DE3) PlyS e Rosetta-Gami
0,6	12°C	<i>overnight</i>	Arctic Express (DE3)

3.11.2 *Western Blot* para confirmação da expressão das proteínas recombinantes

As proteínas expressas foram aplicadas em um gel SDS PAGE. Foi adicionado Tampão de amostra 1X a cada 5µl da fração insolúvel e 15µl da porção solúvel, todas as proteínas foram colocadas durante 5min no banho seco a 95°C e por fim aplicadas no gel. As proteínas foram submetidas a uma potência 30 watts por 50min. Foi realizada a transferência para uma membrana de nitrocelulose em cuba de transferência *Semi-Dry* por 45min a 20v.

Após a transferência, a membrana foi corada com PONCEAU S (2mg/ml de *Ponceau* e 1% de ácido acético). Para isso, a membrana foi submersa no PONCEAU S por 1min e, posteriormente, lavada com água destilada. Em seguida, a membrana foi incubada em uma solução de leite em pó desnatado diluído em PBS-T na concentração de 5% para realizar o bloqueio, durante 1h. Após o tempo de incubação foram realizadas 2 lavagens com PBS-T então foi adicionado o anticorpo primário anti-GST diluído em uma solução de leite em pó 1% em uma diluição de 1:2000. Após 1h de incubação a TA sob agitação, a membrana foi lavada novamente 3 vezes e incubada com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado a fosfatase em uma diluição de 1:10000 por 1h a TA sob agitação. A membrana foi lavada novamente 3 vezes e foi adicionada uma solução de revelação constituída por 5ml de AP buffer (100mM Tris-Cl pH 9.5; 5mM MgCl₂; 100mM NaCl; 33ul de NBT, 16,5ul de BCIP). Após alguns minutos no escuro a reação foi parada com água destilada.

3.11.3 Expressão de RON2 em *E.coli* STAR BL21 (DE3)

A partir de uma única colônia de bactéria *E.coli* STAR BL21 (DE3) competente transformada com o plasmídeo pGEX contendo o gene *Pvron2*, foi feito um pré-inóculo de 50ml contendo LB líquido acrescido de Ampicilina (100ug/ml) incubado *overnight* a 37°C sob agitação de 2000 rpm. No dia seguinte foi feito um inóculo de 3L contendo LB e ampicilina. Foi incubado a 37°C até atingir a densidade óptica (D.O) de 0,6 a 600nm de comprimento de onda. Quando atingiu este valor, o cultivo foi induzido utilizando IPTG 0,8mM, durante 4h a 37°C sob agitação de 200rpm. Após o período de indução, o cultivo foi centrifugado por 10min a 6.000xg a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de bactéria foi congelado a -20°C. No dia seguinte, o *pellet* foi ressuspenso utilizando 25ml de tampão de lise (10 mM Tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) acrescido de coquetel inibidor de protease 1X e incubado por 30min no gelo. Após este tempo, as células foram lisadas no microfluidificador. O lisado foi centrifugado por 30min a 10.000xg e o sobrenadante (fração solúvel) foi separado do *pellet* (fração insolúvel) que foi ressuspendido em solução de lise. Estas duas frações foram submetidas a uma corrida em gel de SDS-PAGE e quando confirmada a presença da banda respectiva a proteína (56kDa) por WB utilizando anticorpo primário anti-GST e também utilizando plasmas de indivíduos infectados e não-infectados por malária e anticorpo secundário anti-mouse IgG e anti-humano IgG conjugado a peroxidase (1:5000). A revelação foi realizada utilizando o Kit *SuperSignal West Pico*

Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific), segundo instruções do fabricante. O lisado solúvel foi purificado.

3.11.4 Expressão de MAEBL-M2 em *E.coli* Arctic Express (DE3)

A partir de uma única colônia de *E.coli* Arctic Express (DE3) competente transformada com o plasmídeo pGEX contendo *maebl-m2*, foi feito um pré-inóculo de 50ml contendo LB líquido acrescido de Ampicilina (100ug/ml) e Gentamicina (34µg/mL) incubado overnight a 37°C sob agitação de 2000 RPM. No dia seguinte, foi realizado o inóculo principal de 3L contendo LB e ampicilina. O restante do procedimento de expressão, lise e confirmação da expressão foi realizado conforme descrito no tópico acima.

3.11.5 Purificação da proteína recombinante

Para a purificação das proteínas expressas foi utilizado o método de purificação por afinidade por GST utilizando Glutathione Sepharose 4B. Um volume de 1,5ml da resina foi utilizada para purificar os 25ml do lisado. A resina foi lavada 3 vezes com PBS 1X. O lisado foi adicionado e incubado por 1h a 4°C sob agitação. Quatro lavagens com PBS 1X foram realizadas e posteriormente foi adicionado 0,5v de tampão de eluição (50mM Tris-HCl; 10mM de glutathione reduzida pH 8,0) à resina ligada à proteína e incubada por 15min. A solução contendo a resina e o tampão de eluição foi centrifugada a 500xg por 5min e o sobrenadante foi coletado. O mesmo procedimento de eluição foi repetido mais 3 vezes. Após expressão e purificação, cada proteína foi concentrada e dialisada em PBS utilizando-se filtros Amicon Ultra-15 (Merck Millipore).

Foi realizada uma corrida em gel de poli(acrilamida) com cada uma das eluições da purificação a 30mA durante 60min. Um gel foi corado com *Coomassie-blue* e outro gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose submetido a 20v por 1h. Foi realizado um WB para reconhecimento das bandas das proteínas expressas utilizando anticorpo anti-GST e revelado por quimioluminescência.

3.11.6 Western blot

Após ser feita a purificação das proteínas, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida e posteriormente um WB conforme descrito no item 3.10.1 para ambas as proteínas. Além do WB utilizando anti-GST, para a proteína MAEBL-M2, foi realizado um segundo WB utilizando anticorpo primário *anti-maeb1* de *P. yoelii* produzido em camundongo e também utilizando plasmas de indivíduos infectados e não-infectados por malária.

3.11.7 Tratamento com Uréia e MgCl₂

Após a purificação da proteína MAEBL-M2 foram visualizadas duas bandas, uma de ~70kda, referente ao domínio M2 e outra banda de ~60kda, possivelmente, correspondente a chaperonina *Cpn60*, que é uma chaperonina de *Oleispira antarthica* co-expressada pela bactéria ARCTIC. A fim de retirar esta chaperona associada, foram realizados dois protocolos utilizando ATP e MgCl₂ e um utilizando diferentes concentrações de ureia.

No primeiro experimento, foi realizada a expressão e purificação da proteína. A este produto purificado foi adicionado 2,5mM de MgCl₂ e 2mM de ATP e então incubado *overnight* a 12°C. No dia seguinte foi feita uma nova purificação seguida de uma corrida em gel de poliacrilamida. O segundo experimento foi realizado utilizando ATP+MgCl₂ de duas formas. A segunda baseou-se em expressar a proteína, seguindo o protocolo previamente citado. No momento da indução, foram adicionados 2,5mM de MgCl₂ ao meio. A expressão ocorreu *overnight* a 12°C. No dia seguinte, foram realizados todos os passos até a purificação da proteína e corrida em gel de poliacrilamida para visualizar a eficácia do tratamento.

Para o tratamento com ureia, foram realizadas lavagens durante o processo de purificação com ureia em três concentrações diferentes (0,5M, 1M e 2M) e posteriormente foi realizada a eluição e eletroforese em gel de poliacrilamida para verificar a eficiência do tratamento.

3.12 Sequenciamento por espectrometria de massas

Após a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida, a banda de ~60kDa foi cortada do gel e enviada para análise por espectrometria de massas no Laboratório de Neuroproteômica (LNP) da UNICAMP a fim de sequenciar e identificar a proteína. As amostras

foram processadas no espectrômetro de massas Waters SYNAPT G2-Si HDMS com nanoACQUITY UPLC.

3.13 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos contra os antígenos MAEBL-M2 e RON2

Este ensaio foi realizado a fim de detectar anticorpos naturalmente adquiridos contra os antígenos MAEBL-M2 e RON2 recombinantes em indivíduos infectados com *P. vivax*. Um total de 90 amostras de plasma de indivíduos sintomáticos, coletadas em Manaus foram utilizadas.

Essencialmente, microplacas foram sensibilizadas com cada uma das proteínas recombinantes em uma concentração de 5µg/mL diluída em tampão Carbonato-Bicarbonato 0,05M e incubadas *overnight* a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T e bloqueadas com uma solução de leite em pó desnatado 5% diluído em PBS-T. Após lavagem com PBS-T, foram incubadas com os plasmas humanos em diluições 1:100 e 1:200. Após incubação por 1 h a TA, anticorpos não aderidos foram retirados por lavagens com PBS-T. Anticorpos aderidos foram detectados por aplicação de um anticorpo anti-IgG humano ou anti-IgM humano conjugado a peroxidase. Após as lavagens, foi adicionado a solução citrato-fostato acrescida de OPD/H₂O₂. A leitura da densidade ótica (D.O.) foi realizada a 490 nm. O experimento foi realizado em duplicata para cada uma das diluições, utilizando anticorpo anti-IgG e anti-IgM. O mesmo foi realizado utilizando a proteína GST. O valor das absorbâncias encontrado para a proteína GST foi subtraído dos valores encontrados para as proteínas MAEBL-M2 e RON2. Além disso, foram utilizadas 21 amostras de plasmas de indivíduos não infectados como controle negativo. Os valores do *cut off* foram determinados pela média de reconhecimento dos plasmas negativos (indivíduos nunca expostos a malária) somado de três desvios padrão. O índice de reatividade (IR) foi dado pela D.O. da amostra dividida pelo valor do *cut off*.

As sequências proteicas de cada uma das proteínas foram avaliadas quanto a sua imunogenicidade utilizando o programa VaxiJen v.2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). Este preditor realiza uma classificação do antígeno baseada nas suas propriedades físico-químicas.

3.14 Ensaio de ligação *in vitro*

Para testar a capacidade adesiva de cada proteína, 50ug de cada proteína expressa foi adicionada a solução de RPMI acrescido de 2% SFB e 2% de hematócrito, utilizando sangue A+. Foram feitas duplicatas de cada proteína (MAEBL-M2, RON2 e GST), além de duplicatas do controle sem proteínas (sem proteína e sem anticorpos), um controle usando apenas o anticorpo primário e outro controle usando apenas o anticorpo secundário. Foram incubadas por 1h sob agitação a temperatura ambiente. Foi adicionado, após 3 lavagens, o anticorpo anti-GST (diluição 1:100) produzido em coelho e incubado por 40min. A ligação da proteína recombinante ao eritrócito foi detectada com anticorpo secundário anti-coelho (diluição 1:100) comercial, conjugado Alexa488 (Molecular Probes). Os eritrócitos foram lavados com PBS 1X, ressuspendido em PBS 1X e 100.000 eventos foram analisados em citômetro de fluxo BD FACSCAria. Os resultados de citometria foram analisados utilizando o software FlowJo®.

3.15 Análise estatística

A análise estatística deste trabalho foi efetuada com o auxílio do *software* Prism™ versão 5.0 (Graphpad,USA). Os testes realizados para cada dado são apresentados juntos aos resultados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4– RESULTADOS

4.1 Amplificação das sequências *maebl* e *ron2* de isolados de *P. vivax*

4.1.1 Amplificação do gene *Pvmaebl* (2.011-3.264nt)

As sequências genômicas de *Plasmodium* sp. são conhecidas por sua alta porcentagem de nucleotídeos Adenina e Timina em seu genoma. Essa característica dificulta as reações de amplificação por PCR. Neste trabalho, diversas tentativas visando a amplificação da sequência referente ao domínio m2 de *maebl* foram realizadas.

Inicialmente foi testado o protocolo descrito por (Michon et al., 2002) seguido de um teste de gradiente de temperaturas de anelamento. Não foi possível obter o produto desejado a partir desta amplificação. Portanto, outras tentativas foram realizadas a fim de obter o fragmento. Foram realizados três testes utilizando: *primers* degenerados, Nested-PCR e, por último, *primers* que amplificavam o gene em três regiões que se sobrepunham, variando as temperaturas de anelamento e utilizando as enzimas Platinum *Taq* DNA polimerasee *Phusion DNA Polymerases*. Os últimos oligos desenhados foram os únicos eficientes na amplificação, quando utilizados com a enzima *Phusion DNA Polymerases* (Thermo Fisher Scientific) que é utilizada para sequências de difícil amplificação, tendo como características alta precisão e velocidade, além de ser tolerante a inibidores da PCR. Mesmo com essa otimização do protocolo, as três amplificações necessárias para obter a sequência desejada foram obtidas em poucas amostras.

O domínio M2 de *Pvmaebl* completo foi amplificado a partir do DNA genômico de 10 amostras provenientes de pacientes infectados com malária vivax sintomática. A Figura 9 mostra o resultado de uma eletroforese em gel de agarose 1% corado com Sybr Safe, no qual foi possível amplificar um produto de 1254pb, correspondente à sequência do domínio m2 do gene *Pvmaebl*. Após a amplificação estes produtos de PCR foram purificados e sequenciados.

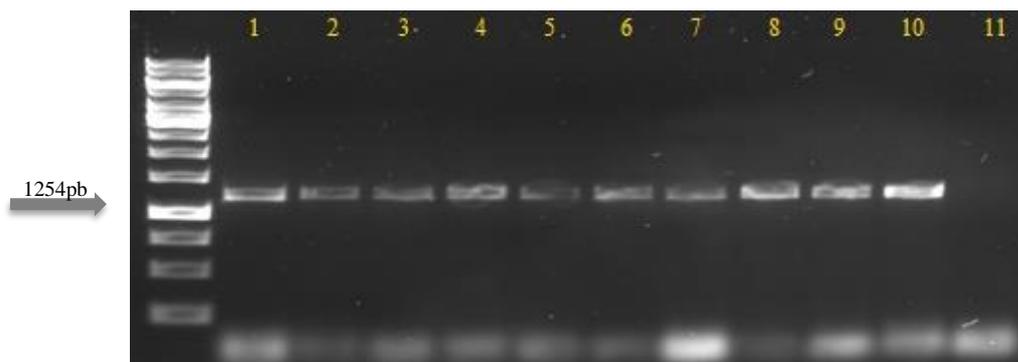


Figura 9. Amplificações de *Pvmaebl* (2.011-3.264nt). Isolados provenientes de Acrelândia: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (Isolados 39A, 11A, 46A, 28A, 17A, 20A, 24A, 25A) e Manaus: 9 e 10 (Isolados 15-22, 12-16) e 11 (controle negativo). Marcador *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder*.

4.2.1 Predição da antigenicidade de RON2

A escolha da região do gene *Pvron2* (PVX_117880) a ser estudada foi baseada nos resultados de predição de antigenicidade, obtidos a partir da análise da sequência de aminoácidos através do programa *IEDB Analysis Resource*.

A partir da análise de sítios antigênicos determinados experimentalmente em proteínas, foi observado que os resíduos hidrofóbicos cisteína, leucina e valina, se estiverem na superfície da proteína, são mais suscetíveis a fazerem parte destes sítios antigênicos. O método de Kolaskar e Tongaonkar utiliza propriedades físico-químicas dos resíduos de aminoácidos e as suas frequências de ocorrência em epítomos conhecidos para prever determinantes antigênicos em proteínas (Kolaskar and Tongaonkar, 1990).

Foram escolhidos os trechos da sequência que apresentaram os melhores resultados segundo este método. Observa-se na Figura 10A o resultado da análise referente à sequência completa da proteína RON2 que contém 2.203 resíduos de aminoácidos. A região predita que mostrou ser mais antigênica está localizada no centro em direção ao C-terminal da proteína RON2, onde os maiores valores para antigenicidade foram encontrados.

Diante deste resultado, foi visto que parte da região que participa da formação do complexo AMA1-RON2 está localizada nesta região. Baseado neste resultado, foi escolhida a sequência contendo 759pb (5481-6240nt), que além de ser uma região que participa parcialmente da formação do complexo AMA1-RON2 também obteve os melhores resultados de *scores* na predição de determinantes antigênicos, demonstrado na Figura 10B.

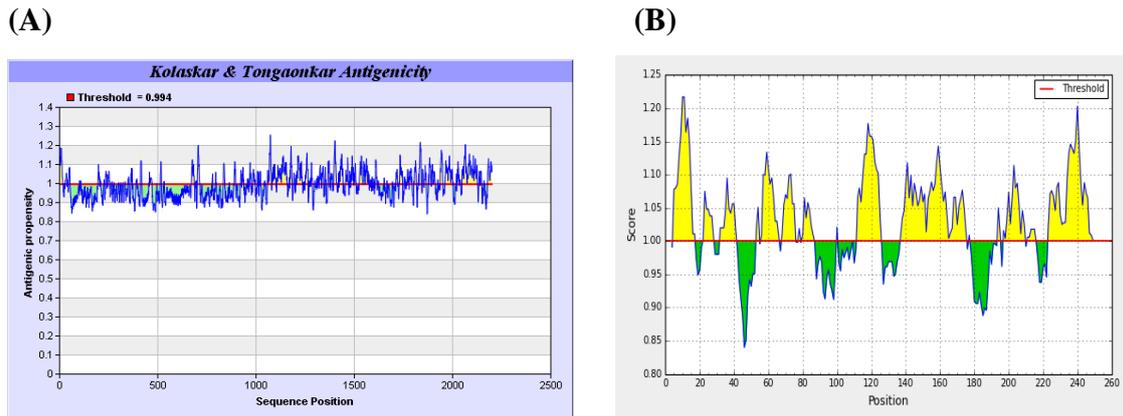


Figura 10. Predição dos determinante antigênicos da proteína RON2. (A) Resultado gráfico da predição da antigenicidade da proteína RON2 utilizando-se o método Kolaskar & Tongaonkar (B). Resultado gráfico da predição da antigenicidade gerado para a região escolhida, entre os aminoácidos 1828-2080aa.

4.2.2 Amplificação do gene *Pvron2* (5481-6240nt)

O fragmento correspondente a sequência entre os nucleotídeos 5481 e 6240 do gene *Pvron2* foi amplificado e sequenciado em 36 amostras de isolados brasileiros provenientes de Manaus, Mâncio Lima e Acrelândia. Na Figura 11 pode ser observado o produto da amplificação de *Pvron2*, onde o fragmento de 759pb pode ser visualizado. Nesta imagem é apresentada a amplificação de *Pvron2* para isolados provenientes de Acrelândia (1,4,5 3 9), Mâncio Lima (2,6 e 7) e Manaus (3,8 e 10).

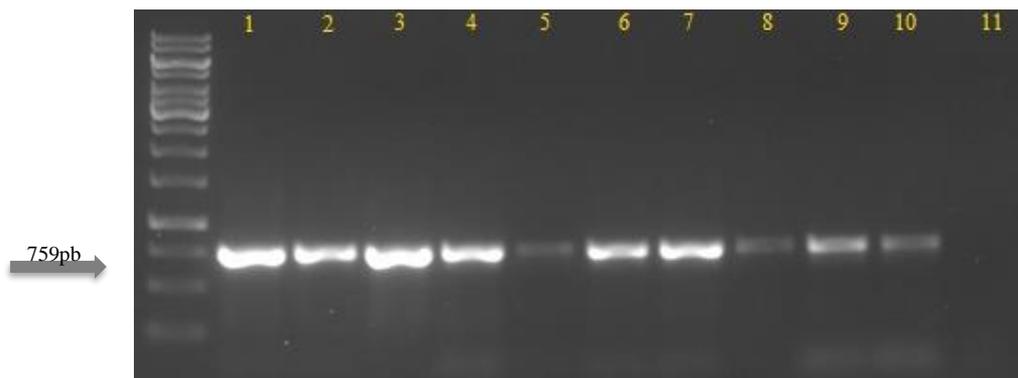


Figura 11. Amplificação de *Pvron2* (5481-6240nt). A imagem mostra o produto de PCR submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1%, corado com SybrSafe, onde é possível observar um produto de 759pb referente a um fragmento de *Pvron2*. Isolados provenientes de Acrelândia: 1, 4, 5, 9 (Isolados 32A, 04A, 829A, 11A); Mâncio Lima: 2, 6, 7 (Isolados 12, 10, 13) e Manaus: 3, 8, 10 (Isolados 12-48, 13-60, 13-04) e 11 (controle negativo). Marcador GeneRuler™ 1kb DNA Ladder.

4.3 Análise das sequências

4.3.1 Análise das sequências correspondentes ao domínio M2 de MAEBL de isolados de *P. vivax*

A partir da análise correspondente ao gene *Pvmaebl* (2.011-3.264nt) de 10 isolados brasileiros foi identificado apenas uma mutação sinônima e uma não-sinônima (isolado PvBA_02A) (Figura 12).

A sequência correspondente ao domínio m2 de *Pvmaebl* também foi analisada globalmente. As sequências brasileiras obtidas neste estudo foram analisadas em conjunto com outras 72 sequências públicas, disponíveis no PlasmDB. Estas sequências públicas são provenientes de isolados da Tailândia, Peru, China, México, Índia, Colômbia, Mauritânia, Coreia do Norte e Brasil. A partir desta análise, foram identificados 9 sítios polimórficos, sendo 7 mutações não-sinônimas, usando como referência de comparação a cepa Sal-1 (PVX_092975).

A partir da análise da sequência proteica de MAEBL-M2 (594-1011aa), foram identificadas 3 mutações únicas (*singletons*) e 4 que se repetem em mais de um isolado. Cabe salientar que na posição 270aa foi visto o mesmo polimorfismo em sequências da Tailândia, Mauritânia, Coreia do Norte, China e México e na posição 388aa visualizou-se a presença de Isoleucina em detrimento de Serina em pelo menos um isolado de cada país, com exceção da Coreia do Norte. A Figura 13 traz sequências representativas de uma amostra de cada local evidenciando os polimorfismos.

As sequências foram analisadas no programa *IEDB Analysis Resource* para predição de epítomos lineares de células B. Foi visto que dos 9 sítios polimórficos, 7 se encontram em regiões preditas como epítomos lineares.

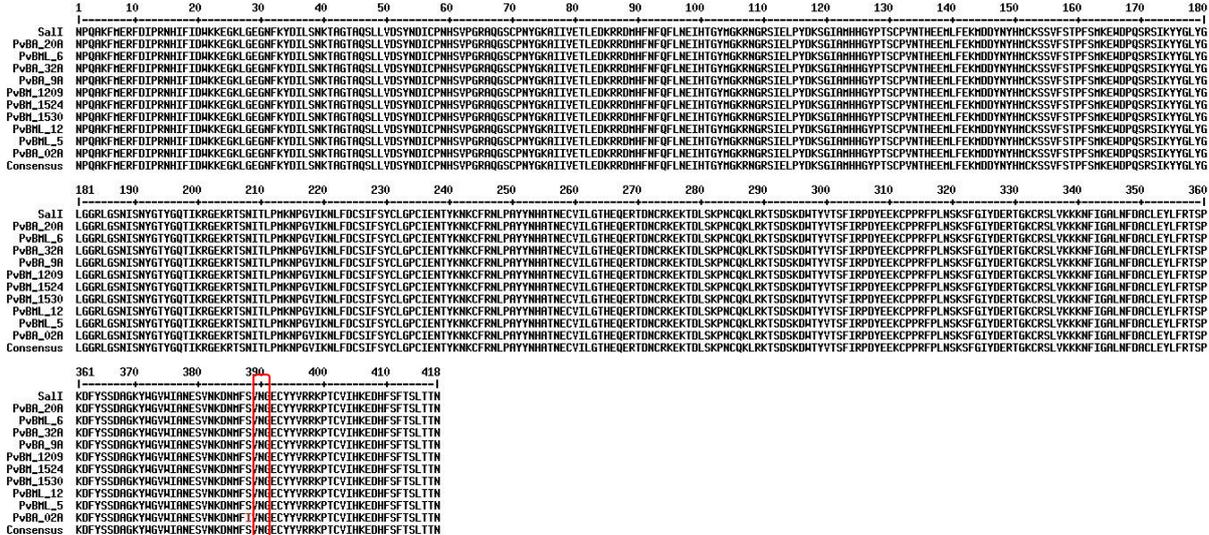


Figura 12. Alinhamento das sequências de MAEBL-M2 (594-1011aa) de isolados brasileiros de *P. vivax*. Sequências proteicas do domínio M2 de isolados brasileiros provenientes dos municípios de Manaus (PvBM_1524, _1209, _1530), Mâncio Lima (PvBML_12, _5, 6), Acrelândia (PvBA_20A, _32A, 02A), comparados com a sequência de *P. vivax* (Sal-1). O alinhamento foi realizado a partir do software *Clustal Multialign Interface Page*.

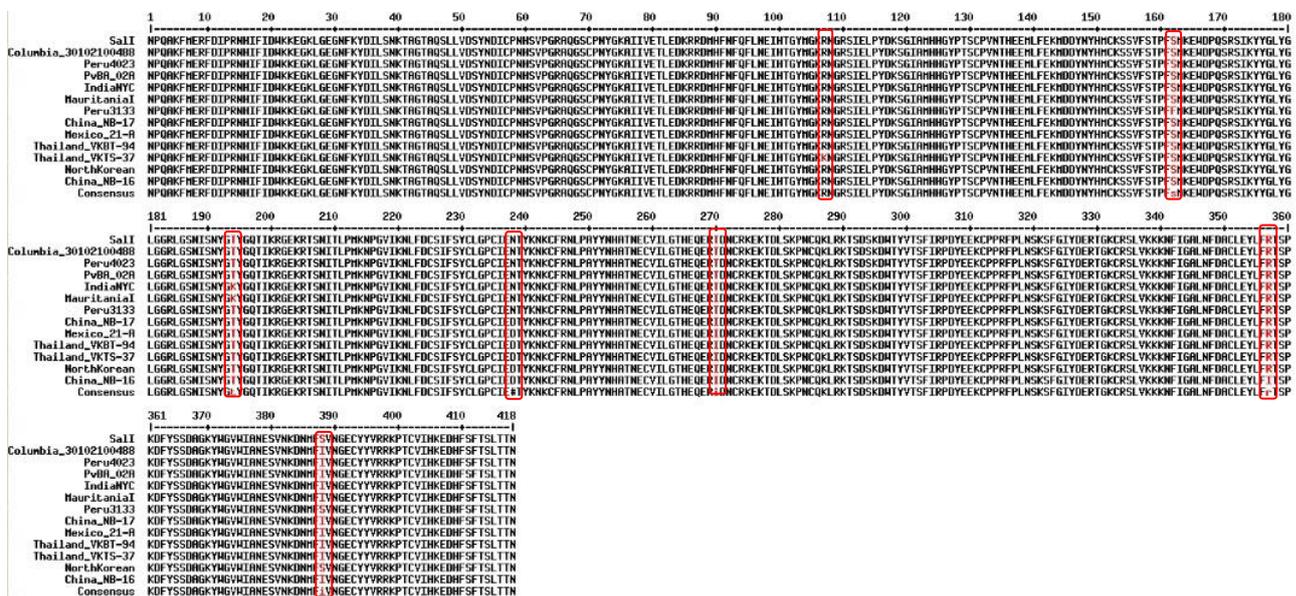


Figura 13. Alinhamento das sequências de MAEBL-M2 (594-1011aa) de isolados de *P. vivax*. Sequências proteicas do domínio M2 de isolados provenientes da Colômbia, Peru, Brasil, Índia, Maurîtânia, China, México, Tailândia e Coréia do Norte, comparados com a sequência de *P. vivax* (Sal-1). O alinhamento foi realizado a partir do software *Clustal Multialign Interface Page*.

4.3.2 Alinhamento das sequências de RON2 de isolados de *P. vivax*

A análise dos 759pb correspondentes ao fragmento gênico de *Pvron2* proveniente dos isolados brasileiros mostrou que houve apenas uma região variável, na sequência de nucleotídeos, entre as 36 sequências analisadas. Quando estas foram alinhadas a outras 104 sequências de outros países, foram identificados apenas 2 sítios polimórfico de mutação sinônima, portanto, as sequências não sofreram alterações. O alinhamento das sequências proteicas representativas de cada um destes locais pode ser observado na Figura 14.

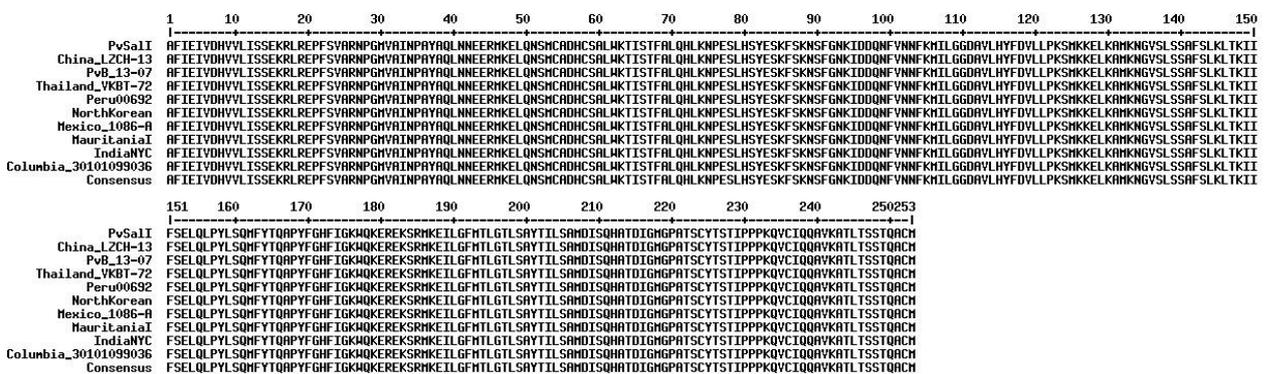


Figura 14. Alinhamento das sequências de RON2 de isolados de *P. vivax*. Sequências de aminoácidos da proteína RON2 de isolados provenientes do Brasil, China, Tailândia, Peru, Maurítânia, Coreia do Norte, Índia e Colômbia, comparadas à sequência de *P. vivax* Sal-1 (PVX_117880). O alinhamento foi realizado a partir do software *Clustal Multialign Interface Page*.

4.4 Padronização da expressão das proteínas recombinantes

A partir da padronização da expressão das proteínas recombinantes em sistema heterólogo bacteriano, onde foram avaliados parâmetros como cepas bacterianas e temperaturas de indução, foram selecionados os protocolos que tiveram o maior rendimento na expressão de proteínas solúveis (Tabela 8).

A Figura 15 mostra os géis com as proteínas expressas não purificadas e submetidas a eletroforese SDS-PAGE, corados com *Coomassie blue* e o resultado obtido após realização do WB utilizando anticorpo anti-GST. Os resultados são referentes às condições que mostraram melhores resultados, são elas: temperaturas de indução a 30°C e 37°C utilizando as cepas bacterianas *E.coli* STAR, pLysS e a 12°C em ARCTIC Express, para ambas as proteínas expressas (MAEBL-M2 e RON2).

É possível visualizar que a proteína MAEBL-M2 foi expressa em maior quantidade na cepa de *E. coli* ARCTIC, representada nas Figuras 15 A-3 e B-3 enquanto a proteína RON2 não teve um nível de expressão elevado, quando comparado a proteína MAEBL-M2, porém foi expressa tanto em *E. coli* STAR quanto em *E. coli* pLysS em proporções semelhantes (Figura 15 D-5 e F-2).

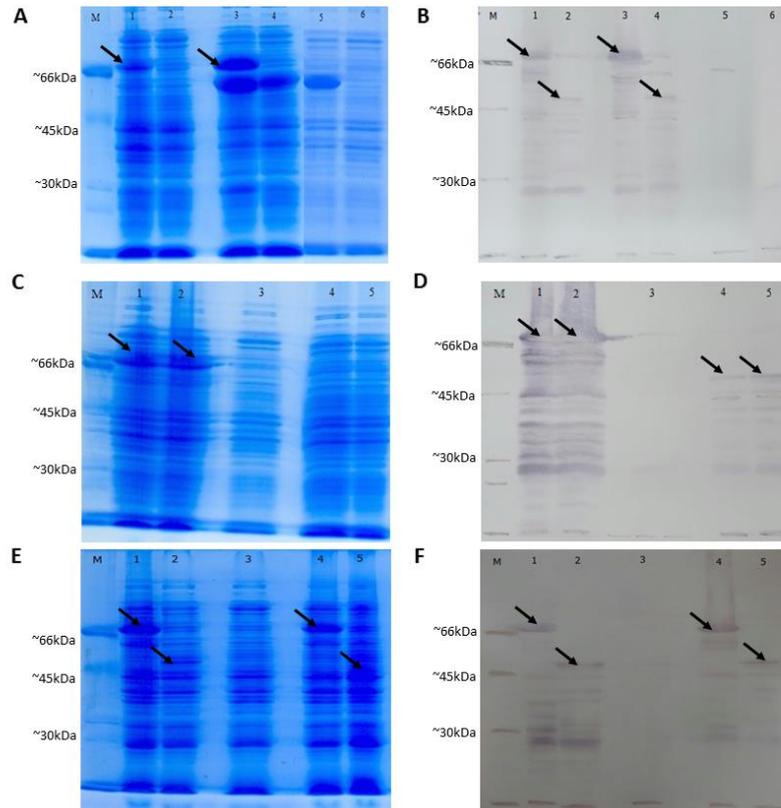


Figura 15. Otimização da expressão das proteínas recombinantes MAEBL-M2 e RON2.

As frações insolúveis das proteínas expressas utilizando as cepas de *E. coli* Arctic, STAR e pLysS foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel SDS-PAGE 12% e, posteriormente, corado com *Coomassie blue* (A, C e E) e o realizado *western blot* (B, D e F). As figuras **A e B** representam **(1)** MAEBL-M2 expressa em STAR induzida a 30°C; **(2)** RON2 expressa em STAR induzida a 30°C; **(3)** MAEBL-M2 expressa em Arctic Express induzida a 12°C, **(4)** RON2 expressa em Arctic Express induzida a 12°C; **(5)** RON2 expressa em Arctic Express não induzida; **(6)** RON2 expressa em STAR não induzida. **C e D** **(1 e 2)** MAEBL-M2 expressa em STAR induzida a 37°C; **(3)** MAEBL-M2 expressa em STAR não induzida **(4 e 5)** RON expressa em STAR induzida a 37°C. **E e F** **(1)** MAEBL expressa em pLysS e induzida a 37°C; **(2)** RON2 expressa em pLysS induzida a 37°C; **(3)** MAEBL expressa em pLysS não induzida; **(4)** MAEBL expressa em pLysS induzida a 30°C; **(5)** RON2 expressa em pLysS induzida a 30°C. As prováveis bandas referentes a cada proteína estão indicadas por setas.

Tabela 8. Condições otimizadas para a expressão das proteínas MAEBL-M2 e RON2.

Proteína	Cepa	Concentração de IPTG	Temperatura de indução	DO 600	Tempo de indução
MAEBL-M2	ARCTIC Express	0,8mM	12°C	0,6	<i>Overnight</i> (16h)
RON2 (1828-2080aa)	BL21 STAR	0,8mM	37°C	0,6	4 horas

4.5 Expressão das proteínas recombinantes

4.5.1 Expressão da proteína PvMAEBL-M2 em ARCTIC *Express*

A proteína MAEBL-M2 foi expressa na cepa bacteriana que obteve maior rendimento na expressão de proteína solúvel (*ARCTIC Express*) e posteriormente purificada e submetida a eletroforese SDS-PAGE e WB. Na Figura 16A é visto a banda de ~74kDa referente ao domínio M2 da proteína MAEBL. É possível ver também uma proteína de ~59kDa referente a chaperonina *Cpn60* que é co-expressada pela bactéria e uma pequena quantidade da GST com ~26kDa.

A Figura 16B mostra o resultado do WB realizado utilizando anticorpo anti-MAEBL de *P. yoelii*. O anticorpo reagiu fortemente à banda da proteína e mostrou um reconhecimento baixo da banda referente à chaperona *Cpn60*, indicando uma possível ligação entre ambas as proteínas. Quando realizado o WB utilizando anticorpo anti-GST a banda correspondente a MAEBL-M2 foi fortemente reconhecida, porém, pode ser visto o reconhecimento da proteína degradada, ou possíveis formas truncadas da proteína abaixo bem como a GST, além de um fraco reconhecimento da *Cpn60* (Figura 16C). A Figura 16D mostra o reconhecimento da proteína pelos anticorpos naturalmente adquiridos de um indivíduo que teve malária.

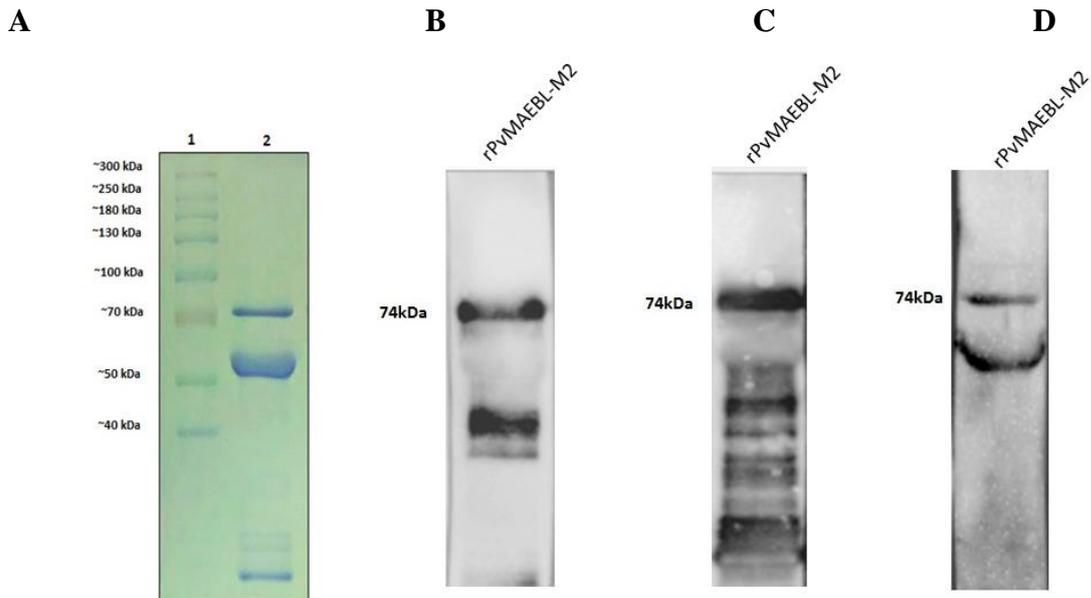


Figura 16. Análise de gel SDS-PAGE sob condições desnaturantes da proteína recombinante PvM2-MAEBL (594-1.011aa) após a purificação. **A.** Gel após coloração utilizando *Coomassie blue*. (1) Marcador molecular *Spectra Multicolor High Range Protein Ladder* (Thermo Scientific) (2) Proteína MAEBL-M2, contendo banda de ~74kDa, comprovando a obtenção do recombinante PvMAEBL-M2 e banda de ~26kDa do *tag* de GST. **B.** WB utilizando anticorpo anti-MAEBL **C.** WB utilizando anticorpo anti-GST **D.** WB utilizando plasma de paciente imune

4.5.2 Expressão da proteína RON2 em *E.coli* STAR

A partir da expressão da proteína PvRON2 realizada pela bactéria da cepa *E.coli* STAR foi visualizada uma banda de ~56kDa referente a proteína de interesse. A Figura 17A mostra a banda referente à proteína. Nota-se uma banda única purificada, além da proteína GST na altura de ~26kDa. A Figura 17B mostra o resultado referente ao WB realizado utilizando plasma de um indivíduo que não foi exposto à malária (controle negativo) e plasma de um indivíduo com malária (controle positivo). Nota-se que houve reconhecimento da proteína pelos anticorpos naturalmente adquiridos (Figura 17B-3). A terceira imagem mostra a proteína sendo reconhecida pelo anticorpo anti-GST (Figura 17C).

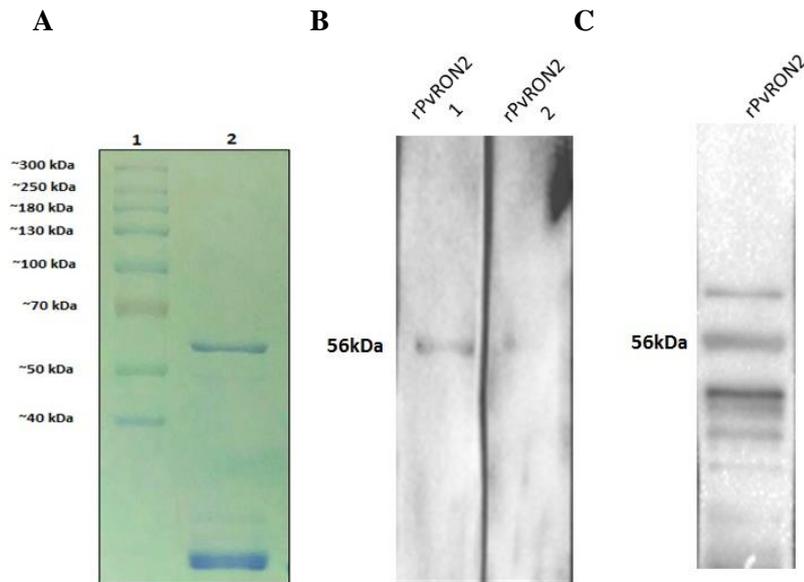


Figura 17. Análise de gel SDS-PAGE sob condições desnaturantes do recombinante PvRON2(1828-2080aa) expresso e purificado e Western blot. **A.** Gel SDS-PAGE corado por Coomassie blue. (1) Marcador molecular *Spectra Multicolor High Range Protein Ladder* (Thermo Scientific) (2) Proteína mostrando banda de ~56kDa comprovando a obtenção do recombinante PvRON2 e banda de ~26kDa do *tag* de GST. **B.** (1) WB utilizando plasmas de pacientes como anticorpo primário (2) plasma de indivíduo negativo para malária **C.** WB utilizando anticorpo anti-GST como anticorpo primário.

4.6 Ensaio de ligação *in vitro*

A capacidade de adesão ao eritrócito das proteínas PvMAEBL-M2 e PvRON2 recombinantes foram avaliadas através de citometria de fluxo. Entretanto, não foi observada diferença estatística significativa na ligação aos eritrócitos entre as duas proteínas e a proteína GST (Figura 18).

A proteína PvDBP, utilizada como controle positivo neste ensaio, apresentou capacidade de adesão similar às demais proteínas. Este resultado difere do esperado, já que DBP é uma proteína reconhecidamente adesiva de *P. vivax*. Entretanto, como todas as proteínas utilizadas neste ensaio foram expressas em bactérias é compreensível que isso tenha interferido na capacidade de adesão das mesmas.

Dessa forma, este resultado é inconclusivo, necessitando ser repetido o experimento utilizando um controle positivo eficiente, para que seja possível comparar sua capacidade de ligação com as proteínas recombinantes.

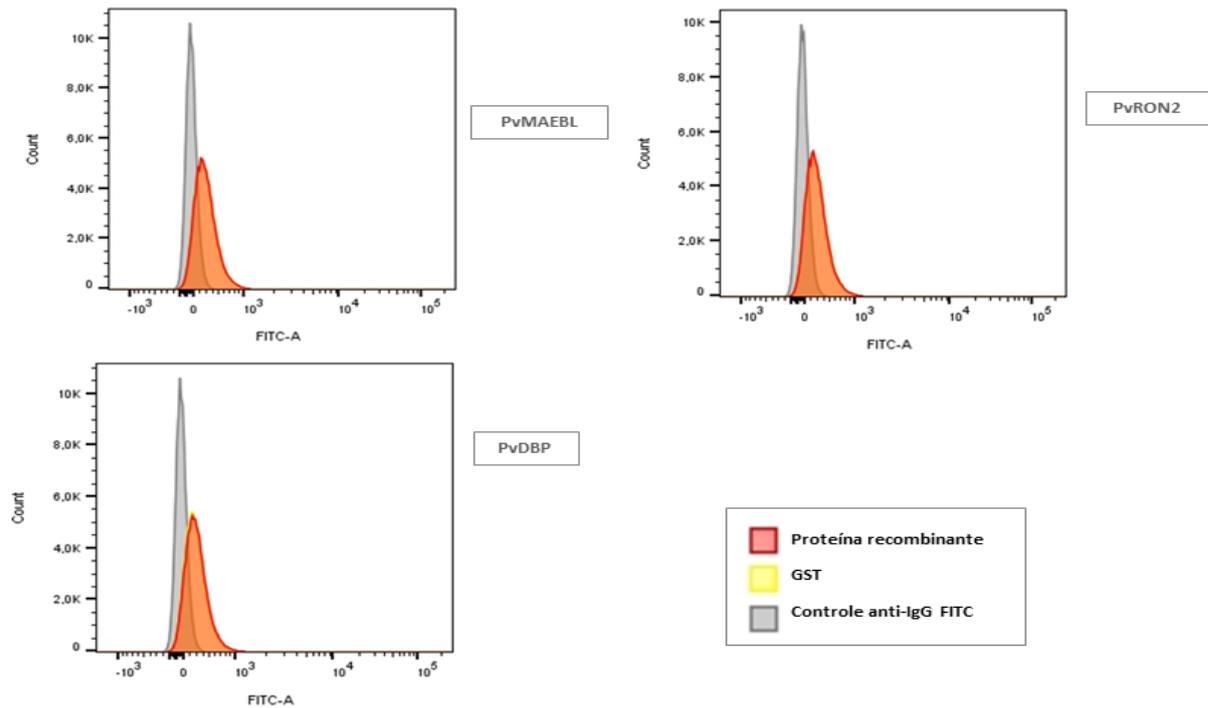


Figura 18. Resultados do ensaio de ligação das proteínas PvMAEBL e PvRON2 recombinantes aos eritrócitos. Eritrócitos foram incubados com as proteínas PvMAEBL-M2 e PvRON2 recombinantes e foram detectadas através de um anticorpo anti-GST, seguido de anticorpo secundário conjugado com FITC Alexa488 (Molecular Probes). Não foram observadas diferenças significativas na adesão a eritrócitos entre as duas proteínas recombinantes e a proteína PvDBP (controle positivo) quando comparadas a proteína GST. Foram adquiridos 100.000 eventos no citômetro de fluxo FACSaria. Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o software FlowJo®.4.4

4.7 Avaliação da resposta imune contra as proteínas recombinantes

4.7.1 Resposta imune contra as proteínas PvMAEBL-M2 e PvRON2

As proteínas recombinantes PvMAEBL-M2 e PvRON2 foram avaliadas por ELISA para a detecção de anticorpos IgG e IgM naturalmente adquiridos presentes no plasma de indivíduos que tiveram malária vivax, residentes em Manaus. A frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra ao menos uma das proteínas recombinantes foi de 51,60%, enquanto 42% dos indivíduos não possuíam anticorpos IgG contra nenhuma das duas proteínas e apenas 6,31% dos indivíduos reconheceram ambas as proteínas. A prevalência de anticorpos anti-MAEBL foi maior que a prevalência de anticorpos anti-RON2 (teste Mann Whitney $p < 0.0001$).

A resposta específica de IgG total e IgM contra a proteína MAEBL-M2 foi avaliada em 97 indivíduos. Nos ensaios realizados contra a proteína MAEBL-M2, a prevalência de

anticorpos IgG naturalmente adquiridos foi de 55,6% na população estudada (Figura 19). Enquanto a prevalência para IgM foi de 4,54% de indivíduos respondedores (Figura 20).

A proteína RON2 foi avaliada da mesma forma, quanto a presença de anticorpos IgG total e IgM naturalmente adquiridos. A prevalência de respondedores para IgG foi de 8,33% (Figura 19) e para IgM não foram visualizadas respostas imune positivas para nenhuma das amostras analisadas.

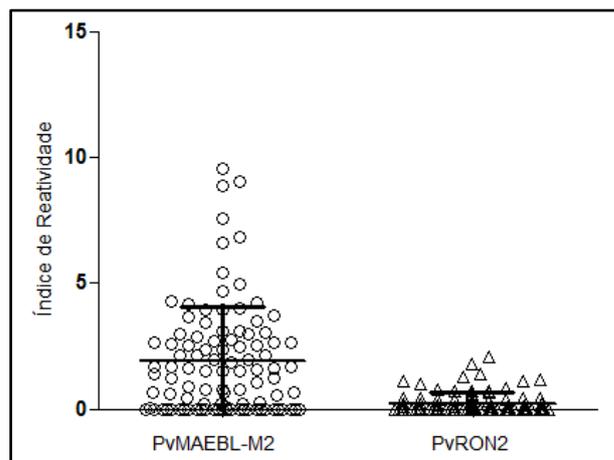


Figura 19. Índice de reatividade de IgG contra as proteínas PvMAEBL e PvRON2. Comparação dos valores individuais de índice de reatividade (IR) para as duas proteínas recombinantes avaliadas. Anticorpos IgG contra as proteínas PvMAEBL-M2 e PvRON2 foram detectados em plasmas de indivíduos expostos à malária. Cada símbolo representa a reatividade do anticorpo IgG individual de cada amostra de plasma testadas por ELISA na diluição 1:100 contra as proteínas PvMAEBL-M2 e PvRON2. O IR foi calculado a partir dos valores de densidade óptica das amostras dividido pelo valor do *cut off*. Os valores do *cut off* foram determinados pela média de reconhecimento dos plasmas negativos (indivíduos nunca expostos a malária) somados a três desvios padrão. As linhas horizontais representam a média dos valores do IR para cada proteína e o desvio padrão.

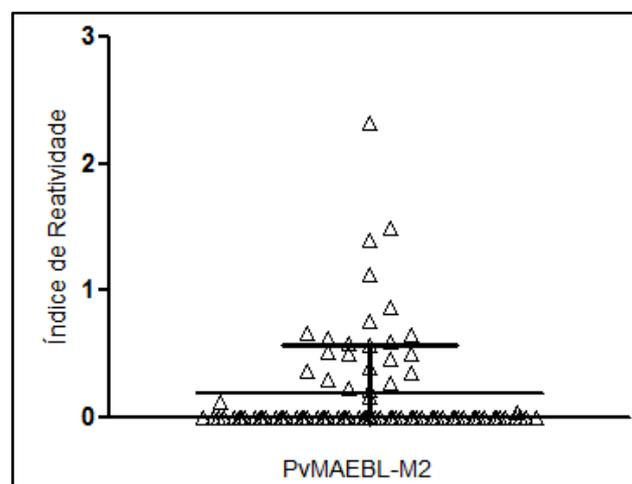


Figura 20. Índice de reatividade de IgM contra a proteína PvMAEBL. Comparação dos valores individuais de índice de reatividade (IR) contra a proteína recombinante PvMAEBL-M2 em plasmas de indivíduos expostos à malária. Cada símbolo representa a reatividade individual de IgM de cada amostra de plasma testada por ELISA na diluição 1:100 contra a proteínas PvMAEBL-M2. O IR foi calculado a partir dos valores de densidade óptica das amostras dividido pelo valor do *cut off*. Os valores do *cut off* foram determinados pela média de reconhecimento dos plasmas negativos (indivíduos nunca expostos a malária) somados a três desvios padrão. As linhas horizontais representam a média dos valores do IR e o desvio padrão.

Cabe salientar que os índices de reatividade gerados por cada indivíduo contra a proteína MAEBL-M2 foram correlacionados com dados dos pacientes, previamente coletados, sobre os níveis de plaqueta, hemoglobina, hematócrito, parasitemia. Porém, não houve correlação entre os parâmetros analisados e a resposta anti-MAEBL.

5. DISCUSSÃO

Ao longo dos últimos anos, o panorama global dos casos de malária tem sofrido grandes modificações. Houve uma grande redução no número de casos e mortes nos últimos 15 anos. Porém, entre as doenças transmitidas por insetos, a malária permanece entre uma das principais parasitoses humanas. As infecções causadas por *P. vivax* possuem uma alta frequência de portadores assintomáticos. Além disso, numerosos estudos clínicos, em diversas localizações geográficas, têm demonstrado que a infecção por *P. vivax* pode causar doença grave e levar a morte (Tjitra et al., 2008; Tyler and Boothroyd, 2011).

As principais estratégias utilizadas para o controle da malária são baseadas no diagnóstico e tratamento, bem como no combate ao vetor. No entanto, o surgimento de cepas resistentes às drogas é constante. Além disso, o combate ao vetor é dificultado devido a resistência destes aos inseticidas. Portanto, novas estratégias para prevenir a malária causada por *P. vivax* são necessárias. Vacinas eficientes contra o *P. vivax* podem resolver as várias lacunas existentes nas ferramentas disponíveis atualmente e facilitar a eliminação e erradicação da doença.

Existem diversas proteínas consideradas potenciais candidatos vacinais contra a malária. Desta forma, deve-se ressaltar a importância dos estudos da diversidade destes genes, da busca por sua origem genética e sua distribuição nas diferentes áreas endêmicas, a fim de garantir uma vacina eficaz. A análise das sequências gênicas é de extrema importância para garantir uma vacina que não tenha resposta alelo-específica.

Atualmente, existem diversos estudos sobre a diversidade genética de proteínas que são potenciais candidatos vacinais. Alguns trabalhos analisaram a diversidade genética das proteínas RON, que estão presentes no complexo que forma a *moving junction*, juntamente com a proteína AMA-1, durante o processo de invasão do eritrócito. Cao e colaboradores buscaram compreender a formação deste complexo de proteínas. Para isso buscaram caracterizar a proteína RON2 de *P. falciparum*. Foram analisados os polimorfismos presentes em *ron2* na região que compreende os nucleotídeos 2459–6570, em cinco cepas de *P. falciparum*, as quais foram comparadas à sequência da cepa referência 3D7. Foram visualizadas 4 substituições não sinônimas que resultaram em 4 modificações na sequência de aminoácidos, mostrando ser alvo de uma seleção positiva (Cao et al., 2009).

Outra proteína RON presente neste complexo, conhecida como RON4, situa-se no interior do eritrócito durante a invasão e ancora o complexo AMA1-RON2. Em um estudo

recente, foi visto que *Pvron4* possui baixa diversidade em relação aos SNPs encontrados, mas possui uma grande quantidade de haplótipos devido às repetições em tandem presentes na porção N-terminal das proteínas, que podem estar associadas a mecanismos de evasão imunológica. Por outro lado, as regiões central e C-terminal são altamente conservadas até mesmo entre espécies, provavelmente devido a uma questão funcional desta região que deve ter sua estrutura mantida. Portanto, as porções central e/ou C-terminal são candidatos promissores para uma vacina de subunidade, uma vez que, devido a sua conservação, evitariam uma resposta imune alelo-específica, aumentando a chance de eficácia da vacina (Buitrago et al., 2016).

Dois domínios C-terminal ricos em cisteína de PfRON2 localizados entre os aminoácidos 1,857 e 2,062 foram estudados a fim de verificar se estão envolvidos na ligação com os eritrócitos e com a proteína AMA-1 durante o processo de invasão. Para isso, estas sequências foram expressas na superfície de células COS-7 a fim de testar a ligação destes fragmentos nos eritrócitos. Foi visto que esta região C-terminal se liga aos eritrócitos humanos (Hossain et al., 2012).

Para avaliar a ligação da PfRON2 com a proteína AMA-1 e identificar a região PfRON2 envolvida nessa interação, o ectodomínio de PfAMA1 e diferentes fragmentos de PfRON2 (PfRON2-M, PfRON2-M1, PfRON2-M2 e PfRON2-C) foram clonados em vetores de expressão de levedura fusionado com os domínios Gal4 pGBKT7 e pGAD. Células de levedura co-transformadas com as construções pGBKT7-PfAMA e pGAD-PfRON2 foram capazes de formar colônias em 3 dias de cultivo. Foi visto que apenas as construções contendo os fragmentos C-terminal de RON2 tiveram crescimento. Esse resultado mostra que os dois domínios ricos em cisteína de PfRON2 interagem diretamente com PfAMA1 (Hossain et al., 2012). Vale ressaltar, que esses fragmentos da porção C-terminal de PfRON2 são homólogos à sequência de PvRON2 avaliada aqui nesta dissertação.

A escolha da região 1828-2080aa da proteína RON2, analisada no presente estudo, teve sua escolha baseada no melhor resultado obtido na predição de determinantes antigênicos pelo método de Kolaskar & Tongaonkar (Kolaskar & Tongaonkar, 1990). Além disso, foram identificados resíduos importantes na ligação de TgAMA1-TgRON2 (Tonkin et al., 2011) que corresponde a região 2035-2073 de PvRON2. Outro fato é que a sequência escolhida está parcialmente localizada na região que está em contato com a proteína AMA-1 na junção formada no momento da invasão do eritrócito. Um estudo recente demonstrou-se que a região entre os domínios transmembrana 1 e 2 está localizada na superfície do eritrócito, onde acontece a ligação à AMA-1 em *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum* (Tyler and Boothroyd,

2011). A região entre os aminoácidos 2033-2099aa de PvRON2 apresenta um ectodomínio que corresponde à sequência de TgRON2, que foi cristalizada na ligação com AMA1 (Tonkin et al., 2011). Todos estes fatores contribuíram para a escolha da região analisada.

A partir dos alinhamentos das 36 sequências brasileiras obtidas para *Pvron2* com outras sequências depositadas em bancos de dados, foram visualizados apenas dois SNPs. Porém, quando essas sequências foram traduzidas para proteínas, nenhuma troca de aminoácidos foi visualizada nestes isolados. Tang e colaboradores analisaram 20 sequências de isolados da China. Diferentes regiões do gene foram analisadas e foram vistas 10 substituições não sinônimas entre as 20 sequências nas posições 1241, 1675, 2146, 2456, 2477, 3182, 4390, 4840, 4988 e 6555 mostrando que nestas regiões o gene está sofrendo seleção positiva. No entanto, na mesma região aqui analisada não foram evidenciadas trocas nos aminoácidos, reafirmando esta é uma região conservada (Tang et al., 2012). A partir do fato desta região ser altamente conservada, pode-se inferir que é uma região importante funcionalmente, e interessante de ser avaliada em uma formulação vacinal que não seja alelo-específica.

Outra sequência estudada aqui neste trabalho foi o correspondente ao domínio M2 da proteína MAEBL, sendo este o principal responsável pela capacidade adesiva de MAEBL durante a invasão ao eritrócito (Ocampo et al., 2004). Vale ressaltar, que até o presente momento não existem trabalhos relatando a diversidade deste gene.

Uma das dificuldades encontrados neste trabalho foi a amplificação do gene codificador da proteína MAEBL-M2. As sequências genômicas de *Plasmodium* sp. são conhecidas por sua alta porcentagem de nucleotídeos A/T em seu genoma. Essa característica dificulta tanto nas reações de amplificação por PCR quanto no sequenciamento. Isso foi visto nas amplificações do domínio m2 do gene *maebl*. Regiões desta sequência, principalmente no início da sequência, possuíam muitas bases AT, o que dificultou o anelamento das sequências iniciadoras e conseqüentemente os processos de amplificação. Posteriormente o mesmo problema foi visto ao tentar sequenciar este domínio. Devido a isso, obteve-se um número limitado de sequências na análise da diversidade genética.

Entre os 10 isolados brasileiros estudados, apenas uma alteração na sequência gênica e proteica de PvMAEBL-M2 foi visualizada. No entanto, quando PvMAEBL-M2 foi avaliada globalmente, onde 72 isolados provenientes de outros oito países foram analisados, foram observadas sete trocas de aminoácidos quando comparado a sequência da cepa de *P. vivax* Salvador-I. Entre estas trocas, na posição 270aa foi observado o mesmo polimorfismo nas sequências da Tailândia, China e México. Na posição 388aa visualizou-se a presença de Isoleucina em detrimento de Serina em pelo menos um isolado de cada país, com exceção da

Coréia do Norte. Este resultado se mostra interessante visto que apesar de haver mudanças de aminoácidos na sequência, essas modificações se repetem em parasitos de isolados de localidades distantes, o que indica uma conservação nas sequências mesmo em amostras de países diferentes. Isto sugere que MAEBL-M2, assim como RON2, é um potencial candidato vacinal.

Foi relatado em *P. falciparum* que este parasito possui códons raros para *E. coli*. Com isso torna-se comum em seu genoma a presença de “domínios perturbadores”, que são longas inserções repetitivas e de baixa complexidade separando blocos proteicos conservados. Isto pode causar o término precoce do processo de tradução, gerando formas truncadas da proteína que está sendo expressa no sistema heterólogo (Flick et al., 2004). Além disso, a superprodução da proteína recombinante por *E. coli* pode gerar agregados ou corpos de inclusão apesar da presença do sistema nativo de chaperonas da bactéria (Belval et al., 2015).

Apesar de existirem sistemas de expressão alternativos, por exemplo, em levedura ou baculovírus, a expressão em *E. coli* é mais frequentemente utilizado devido a rapidez na expressão e grande quantidade de biomassa obtida, baixo custo e por não necessitar equipamentos sofisticados na expressão. No entanto, a qualidade das proteínas expressas muitas vezes não é satisfatória (Flick et al., 2004). Optou-se por usar o sistema de expressão heterólogo bacteriano devido a estas vantagens citadas. Para tentar solucionar os problemas provenientes das características do gene do parasito, sintetizou-se o vetor de expressão com o gene códon-otimizado. Além disso, várias cepas e condições foram testadas a fim de obter-se uma maior quantidade de proteína solúvel.

Para superar a dificuldade de expressar proteínas solúveis, é indicado a diminuição da temperatura após indução. Ou ainda, utilizar cepas que expressam chaperonas exógenas, como é visto na cepa ARCTIC Express, que expressa duas chaperonas (*Cpn60* e *Cpn10*) provenientes da bactéria psicrófila *Oleispira antarctica*, que auxiliam na dobragem correta das proteínas de interesse e evitam, ou limitam, a acumulação de corpos de inclusão (Belval et al., 2015; Gopal and Kumar, 2013). Esta cepa foi testada, neste estudo, para expressar ambas as proteínas de interesse.

A proteína PvRON2 não apresentou níveis de expressão de proteína solúvel aumentado nesta bactéria, portanto, foram escolhidas as cepas bem como as condições que necessitavam menor tempo de expressão e maior facilidade na manipulação e menor uso de antibióticos. Foi visto no resultado do WB um reconhecimento específico da proteína pelos anticorpos naturalmente adquiridos de um indivíduo com malária.

Para a proteína PvMAEBL-M2 foi constatado que a cepa ARCTIC era capaz de expressar maior quantidade da proteína solúvel. Sabe-se que, muitas vezes, as chaperonas co-purificam com a proteína de interesse, podendo modificar a atividade e/ou estabilidade do produto (Belval et al., 2015). Para todas as cepas testadas, uma banda de ~60kDa foi visualizada, mesmo após a purificação por afinidade ao GST. Esta banda de ~60kDa foi sequenciada por espectrometria de massas para identificar a sua origem. O resultado mostrou que a banda é correspondente a chaperona *Cpn60* da bactéria *Oleispira antarctica*. Porém, apesar de várias tentativas para purificar a proteína PvMAEBL-M2 isolada, não tivemos êxito nos protocolos utilizados.

Os ensaios de ELISA e de ligação ao eritrócito *in vitro* foram realizados para PvRON2 e também para PvMAEBL-M2, a fim de verificar a presença de anticorpos naturalmente adquiridos contra a proteína expressa e a capacidade de ligação das proteínas na hemácia.

O ensaio de ligação *in vitro* não apresentou diferença estatística significativa na ligação aos eritrócitos entre as duas proteínas e a proteína GST. Porém, a proteína PvDBP, utilizada como controle positivo, apresentou capacidade de adesão similar às demais proteínas, invalidando o resultado do experimento. Entretanto, como todas as proteínas utilizadas neste ensaio foram expressas em bactérias é possível que isso tenha interferido na capacidade de adesão das mesmas. Além disso, o ensaio não foi realizado com sangue rico em reticulócitos, célula alvo na invasão por *P. vivax*. Portanto, os resultados obtidos não são conclusivos, evidenciando-se a necessidade de repetição do experimento.

Para a avaliação do potencial imunogênico das duas proteínas aqui estudadas, 97 amostras de plasma de pacientes com sintomas clínicos de malária foram utilizadas para detecção de anticorpos IgG naturalmente adquiridos.

Os resultados mostraram que a proteína PvMAEBL-M2 foi mais frequentemente reconhecida que a proteína PvRON2, onde 55,6% dos indivíduos tiveram anticorpos IgG contra apenas 8,33% dos indivíduos tiveram anticorpos contra RON2.

A resposta imunológica contra a proteína MAEBL-M2 foi recentemente avaliada por nosso grupo de pesquisa, no modelo murino de *P. yoelii* (Leite et al 2015). Neste trabalho observou-se uma resposta de IgM e IgG contra o domínio M2 e região repetitiva, respectivamente. A proteína recombinante rPyM2-MAEBL mostrou-se altamente imunogênica quando inoculada em camundongo C57BL/6J e após desafio utilizando a cepa murina letal *P. yoelii*, 90% dos animais sobreviveram, além de ter sido observado uma redução na parasitemia (Leite et al., 2015). Estes dados reforçam MAEBL-M2 como potencial candidato vacinal.

Ensaio de *western blot* foram realizados utilizando os plasmas de pacientes infectados com *P. vivax*. Foi visto que os anticorpos naturalmente adquiridos reconhecem a proteína PvMAEBL-M2 após a sua purificação. No entanto, não é claro se a chaperona co-purificada também é reconhecida e o quanto estaria influenciando a detecção da resposta específica anti-MAEBL.

Os ensaios realizados com a proteína RON2 mostraram uma resposta de anticorpos contra a proteína de 8,33% para IgG. No entanto, não foi detectado anticorpos naturalmente adquiridos da classe IgM. Quando comparado a PvMAEBL-M2, RON2 foi menos reconhecida. Vale ressaltar, que em ensaios de *western blot* a proteína PvRON2 foi reconhecida de maneira específica pelo plasma de pacientes infectados com *P. vivax*.

Na análise de predição de imunogenicidade para os domínios proteicos de cada uma das proteínas, utilizando o programa VaxiJen, PvMAEBL-M2 apresentou o valor 0.5845, sendo um provável antígeno e PvRON2 apresentou o resultado 0.466, que é um valor próximo ao *threshold* de 0,5, porém, não pode ser considerado imunogênico. Estes valores corroboram com o resultado visto nos testes de ELISA.

A partir dos resultados deste trabalho elucidou-se as características polimórficas dos genes *Pvmaebl* e *Pvron2* e foi caracterizada a reação das proteínas frente aos anticorpos naturalmente adquiridos de pacientes com malária. Este foi um passo inicial no estudo destes potenciais candidatos vacinais. Novos testes devem ser realizados a fim de avançar no conhecimento destes antígenos e da sua capacidade protetora, visando uma formulação vacinal eficaz.

6. CONCLUSÕES

- As proteínas MAEBL-M2 e RON2 de *Plasmodium vivax* são conservadas entre cepas de diferentes localizações geográficas.
- As proteínas PvMAEBL-M2 e PvRON2 foram reconhecidas por anticorpos naturalmente adquiridos.
- As duas proteínas apresentam potencial como candidato vacinal devido a baixa diversidade genética e imunogenicidade.

7. MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Lista de sequências utilizadas na análise de polimorfismos da proteína MAEBL

Localidade	Números de acesso	Banco de dados	Número de sequências
Brasil	KX061005.1; KX061005.1; KX061006.1; KX061007.1; KX061008.1; KX061009.1; KX061010.1; KX061011.1; KX061012.1	Genbank	10
Tailândia	Thailand_VKBT-101; Thailand_VKBT-100; Thailand_VKTS-39; ThailandVKBT106; ThailandVKBT71; ThailandVKBT72; ThailandVKBT94;ThailandVKBT95;ThailandVKBT98; ThailandVKBT99;ThailandVKTS36;ThailandVKTS37; ThailandVKTS45; ThailandVKTS52.	PlasmoDB	14
Peru	Peru00692; Peru00699; Peru07; Peru1008; Peru2025; Peru257; Peru259; Peru260; Peru262; Peru3133; Peru3136; Peru3232; Peru4023; Peru852; Peru99622.	PlasmoDB	15
China	China_LZCH-20; China_LZCH-4; China_NB-15; China_NB-16; China_NB-17.	PlasmoDB	5
Colômbia	Columbia_30102100438-A;Columbia_30101099040; Columbia_30101099036;Columbia_30102100437; Columbia_30102100438-B;Columbia_30102100439; Columbia_30102100446;Columbia_30102100440; Columbia_30102100441-A;Columbia_30102100441-B; Columbia_30102100445;Columbia_30102100448; Columbia_30102100485;Columbia_30102100486; Columbia_30102100488;Columbia_30111110020; Columbia_30111110026;Columbia_30111110015; Columbia_30103103280;Columbia_30102100504; Columbia_30102100489;Columbia_30102100490;	PlasmoDB	22
Índia	IndiaNYC; IndiaVII	PlasmoDB	2
Mauritânia	MauritaniaI	PlasmoDB	1
Coreia do Norte	NorthKorea	PlasmoDB	1
México	Mexico_1086-A; Mexico_118-A; Mexico161-04; Mexico_165-A, Mexico_203-04; Mexico_21-A; Mexico_267-A; Mexico_32-E-03; Mexico_330-A; Mexico_55-03; Mexico_566-A; Mexico_63-08; Mexico_760-A1; Mexico_938-A; Mexico_980-A.	PlasmoDB	15

Tabela S2. Lista de seqüências utilizadas na análise de polimorfismos da proteína RON2

Localidade	Números de acesso	Banco de dados	Número de seqüências
Brasil	Isolados de Manaus, Acrelândia e Mâncio Lima. Em processo de submissão.	Genbank	36
Brasil	BrazilI; Brazil32; Belem	PlasmoDB	3
Tailândia	Thailand_VKBT-100; Thailand_VKBT-101; Thailand_VKBT-106; Thailand_VKBT-71; Thailand_VKBT-72; Thailand_VKBT-94; Thailand_VKBT-95; Thailand_VKBT-98; Thailand_VKBT-99; Thailand_VKTS-36; Thailand_VKTS-37; Thailand_VKTS-39; Thailand_VKTS-45; Thailand_VKTS-52.	PlasmoDB	14
Peru	Peru00692; Peru00699; Peru06; Peru07; Peru08; Peru1008; Peru2025; Peru257; Peru259; Peru260; Peru262; Peru3133; Peru3136; Peru3232; Peru4023; Peru852; Peru858; Peru872; Peru99622.	PlasmoDB	19
China	BAM13385.1; BAM13382.1; BAM13379.1; BAM13376.1; BAM13373.1; BAM13370.1; BAM13367.1; BAM13366.1; BAM13384.1; BAM13381.1; BAM13378.1; BAM13375.1; BAM13372.1; BAM13369.1; BAM13383.1; BAM13380.1; BAM13377.1; BAM13374.1; BAM13371.1; BAM13368.1	GenBank	20
China	China_NB-17; China_LZCH-13; China_NB-13-1; China_NB-15; China_NB-16	PlasmoDB	5
Colômbia	Columbia_30102100438-A; Columbia_30101099040; Columbia_30101099036; Columbia_30102100437; Columbia_30102100438-B; Columbia_30102100439; Columbia_30102100446; Columbia_30102100440; Columbia_30102100441-A; Columbia_30102100441-B; Columbia_30102100445; Columbia_30102100448; Columbia_30102100485; Columbia_30102100486; Columbia_30102100488; Columbia_30111110020; Columbia_30111110026; Columbia_30111110015; Columbia_30103103280; Columbia_30102100504; Columbia_30102100489; Columbia_30102100490; Columbia_30102100491	PlasmoDB	23
Índia	IndiaNYC; IndiaVII	PlasmoDB	2
Mauritânia	MauritaniaI	PlasmoDB	1
Coréia do Norte	NorthKorean	PlasmoDB	1
México	Mexico_118-A; Mexico_203-04; Mexico_32-E-03; Mexico_566-A; Mexico_938-A; Mexico_161-04; Mexico_21-A; Mexico_330-A; Mexico_63-08; Mexico_980-A; Mexico_165-A; Mexico_267-A; Mexico_55-03; Mexico_760-A;	PlasmoDB	14

8. REFERÊNCIAS

1. Adams, J.H., Blair, P.L., Kaneko, O., Peterson, D.S., 2001. An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. Trends Parasitol 17, 297-299.
2. Alexander, D.L., Arastu-Kapur, S., Dubremetz, J.F., Boothroyd, J.C., 2006. *Plasmodium falciparum* AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in *Toxoplasma gondii*. Eukaryot Cell 5, 1169-1173.
3. Alexander, D.L., Mital, J., Ward, G.E., Bradley, P., Boothroyd, J.C., 2005. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. PLoS Pathog 1, e17.
4. Alexandre, M.A., Ferreira, C.O., Siqueira, A.M., Magalhães, B.L., Mourão, M.P., Lacerda, M.V., Alecrim, M., 2010. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. Emerg Infect Dis 16, 1611-1614.
5. Alonso, P.L., Sacarlal, J., Aponte, J.J., Leach, A., Macete, E., Milman, J., Mandomando, I., Spiessens, B., Guinovart, C., Espasa, M., Bassat, Q., Aide, P., Ofori-Anyinam, O., Navia, M.M., Corachan, S., Ceuppens, M., Dubois, M.C., Demoitié, M.A., Dubovsky, F., Menéndez, C., Tornieporth, N., Ballou, W.R., Thompson, R., Cohen, J., 2004. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. Lancet 364, 1411-1420.
6. Anstey, N.M., Russell, B., Yeo, T.W., Price, R.N., 2009. The pathophysiology of vivax malaria. Trends Parasitol 25, 220-227.
7. Armistead, J.S., Morlais, I., Mathias, D.K., Jardim, J.G., Joy, J., Fridman, A., Finnefrock, A.C., Bagchi, A., Plebanski, M., Scorpio, D.G., Churcher, T.S., Borg, N.A., Sattabongkot, J., Dinglasan, R.R., 2014. Antibodies to a single, conserved epitope in Anopheles APN1 inhibit universal transmission of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. Infect Immun 82, 818-829.
8. Arévalo-Pinzón, G., Curtidor, H., Patiño, L.C., Patarroyo, M.A., 2011. PvRON2, a new *Plasmodium vivax* rhoptry neck antigen. Malar J 10, 60.
9. Bai, T., Becker, M., Gupta, A., Strike, P., Murphy, V.J., Anders, R.F., Batchelor, A.H., 2005. Structure of AMA1 from *Plasmodium falciparum* reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 12736-12741.
10. Baird, K.J., Maguire, J.D., Price, R.N., 2012. Diagnosis and treatment of *Plasmodium vivax* malaria. Adv Parasitol 80, 203-270.

11. Barry, A.E., Arnott, A., 2014. Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. *Front Immunol* 5, 359.
12. Bauza, K., Malinauskas, T., Pfander, C., Anar, B., Jones, E.Y., Billker, O., Hill, A.V., Reyes-Sandoval, A., 2014. Efficacy of a *Plasmodium vivax* malaria vaccine using ChAd63 and modified vaccinia Ankara expressing thrombospondin-related anonymous protein as assessed with transgenic *Plasmodium berghei* parasites. *Infect Immun* 82, 1277-1286.
13. Belval, L., Marquette, A., Mestre, P., Piron, M.C., Demangeat, G., Merdinoglu, D., Chich, J.F., 2015. A fast and simple method to eliminate Cpn60 from functional recombinant proteins produced by *E. coli* Arctic Express. *Protein Expr Purif* 109, 29-34.
14. Bennett, J.W., Yadava, A., Tosh, D., Sattabongkot, J., Komisar, J., Ware, L.A., McCarthy, W.F., Cowden, J.J., Regules, J., Spring, M.D., Paolino, K., Hartzell, J.D., Cummings, J.F., Richie, T.L., Lumsden, J., Kamau, E., Murphy, J., Lee, C., Parekh, F., Birkett, A., Cohen, J., Ballou, W.R., Polhemus, M.E., Vanloubbeeck, Y.F., Vekemans, J., Ockenhouse, C.F., 2016. Phase 1/2a Trial of *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004423.
15. Blackman, M.J., Bannister, L.H., 2001. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol* 117, 11-25.
16. Bojang, K.A., Milligan, P.J., Pinder, M., Vigneron, L., Allouche, A., Kester, K.E., Ballou, W.R., Conway, D.J., Reece, W.H., Gothard, P., Yamuah, L., Delchambre, M., Voss, G., Greenwood, B.M., Hill, A., McAdam, K.P., Tornieporth, N., Cohen, J.D., Doherty, T., RTS,S/M.V.T.T., 2001. Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet* 358, 1927-1934.
17. Boothroyd, J.C., Dubremetz, J.F., 2008. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol* 6, 79-88.
18. Bouillet, L., Dias, M.O., Dorigo, N.A., Moura, A.D., Russell, B., Nosten, F., Renia, L., Braga, E.M., Gazzinelli, R.T., Rodrigues, M.M., Soares, I.S., Bruna-Romero, O., 2011. Long-term humoral and cellular immune responses elicited by a heterologous *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 protein prime/adenovirus boost immunization protocol. *Infect Immun* 79, 3642-3652.

19. Buitrago, S.P., Garzón-Ospina, D., Patarroyo, M.A., 2016. Size polymorphism and low sequence diversity in the locus encoding the *Plasmodium vivax* rhoptry neck protein 4 (PvRON4) in Colombian isolates. *Malar J* 15, 501.
20. Bull, P.C., Lowe, B.S., Kortok, M., Molyneux, C.S., Newbold, C.I., Marsh, K., 1998. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med* 4, 358-360.
21. Cao, J., Kaneko, O., Thongkukiatkul, A., Tachibana, M., Otsuki, H., Gao, Q., Tsuboi, T., Torii, M., 2009. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites. *Parasitol Int* 58, 29-35.
22. Chitnis, C.E., Miller, L.H., 1994. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med* 180, 497-506.
23. Chitnis, C.E., Sharma, A., 2008. Targeting the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein. *Trends Parasitol* 24, 29-34.
24. Clyde, D.F., 1975. Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg* 24, 397-401.
25. Coetzee, M., Craig, M., le Sueur, D., 2000. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol Today* 16, 74-77.
26. COHEN, S., MCGREGOR, I.A., CARRINGTON, S., 1961. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 192, 733-737.
27. Collins, C.R., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Blackman, M.J., 2009. An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. *PLoS Pathog* 5, e1000273.
28. Costa, F.T., Lopes, S.C., Albrecht, L., Ataide, R., Siqueira, A.M., Souza, R.M., Russell, B., Renia, L., Marinho, C.R., Lacerda, M.V., 2012. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol* 42, 1099-1105.
29. Cowman, A.F., Crabb, B.S., 2006. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 124, 755-766.
30. Daly, T.M., Long, C.A., 1993. A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii yoelii* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. *Infect Immun* 61, 2462-2467.
31. Darko, C.A., Angov, E., Collins, W.E., Bergmann-Leitner, E.S., Girouard, A.S., Hitt, S.L., McBride, J.S., Diggs, C.L., Holder, A.A., Long, C.A., Barnwell, J.W., Lyon, J.A., 2005. The clinical-grade 42-kilodalton fragment of merozoite surface protein 1 of

- Plasmodium falciparum* strain FVO expressed in *Escherichia coli* protects *Aotus nancymai* against challenge with homologous erythrocytic-stage parasites. *Infect Immun* 73, 287-297.
32. de Cassan, S.C., Shakri, A.R., Llewellyn, D., Elias, S.C., Cho, J.S., Goodman, A.L., Jin, J., Douglas, A.D., Suwanarusk, R., Nosten, F.H., Rénia, L., Russell, B., Chitnis, C.E., Draper, S.J., 2015. Preclinical Assessment of Viral Vectored and Protein Vaccines Targeting the Duffy-Binding Protein Region II of *Plasmodium vivax*. *Front Immunol* 6, 348.
 33. Devi, Y.S., Mukherjee, P., Yazdani, S.S., Shakri, A.R., Mazumdar, S., Pandey, S., Chitnis, C.E., Chauhan, V.S., 2007. Immunogenicity of *Plasmodium vivax* combination subunit vaccine formulated with human compatible adjuvants in mice. *Vaccine* 25, 5166-5174.
 34. Dutta, S., Sullivan, J.S., Grady, K.K., Haynes, J.D., Komisar, J., Batchelor, A.H., Soisson, L., Diggs, C.L., Heppner, D.G., Lanar, D.E., Collins, W.E., Barnwell, J.W., 2009. High antibody titer against apical membrane antigen-1 is required to protect against malaria in the *Aotus* model. *PLoS One* 4, e8138.
 35. Escalante, A.A., Lal, A.A., Ayala, F.J., 1998. Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genetics* 149, 189-202.
 36. Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8, 175-185.
 37. Flick, K., Ahuja, S., Chene, A., Bejarano, M.T., Chen, Q., 2004. Optimized expression of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domains in *Escherichia coli*. *Malar J* 3, 50.
 38. García-Basteiro, A.L., Bassat, Q., Alonso, P.L., 2012. Approaching the target: the path towards an effective malaria vaccine. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 4, e2012015.
 39. Gaur, D., Chitnis, C.E., 2011. Molecular interactions and signaling mechanisms during erythrocyte invasion by malaria parasites. *Curr Opin Microbiol* 14, 422-428.
 40. Gaur, D., Mayer, D.C., Miller, L.H., 2004. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. *Int J Parasitol* 34, 1413-1429.
 41. Genton, B., D'Acremont, V., Rare, L., Baea, K., Reeder, J.C., Alpers, M.P., Müller, I., 2008. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med* 5, e127.

42. Ghai, M., Dutta, S., Hall, T., Freilich, D., Ockenhouse, C.F., 2002. Identification, expression, and functional characterization of MAEBL, a sporozoite and asexual blood stage chimeric erythrocyte-binding protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 123, 35-45.
43. Giovannini, D., Späth, S., Lacroix, C., Perazzi, A., Bargieri, D., Lagal, V., Lebugle, C., Combe, A., Thiberge, S., Baldacci, P., Tardieux, I., Ménard, R., 2011. Independent roles of apical membrane antigen 1 and rhoptry neck proteins during host cell invasion by apicomplexa. *Cell Host Microbe* 10, 591-602.
44. Gomez, A., Suarez, C.F., Martinez, P., Saravia, C., Patarroyo, M.A., 2006. High polymorphism in *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-5 (MSP5). *Parasitology* 133, 661-672.
45. Gopal, G.J., Kumar, A., 2013. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J* 32, 419-425.
46. Grimberg, B.T., Udomsangpetch, R., Xainli, J., McHenry, A., Panichakul, T., Sattabongkot, J., Cui, L., Bockarie, M., Chitnis, C., Adams, J., Zimmerman, P.A., King, C.L., 2007. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *PLoS Med* 4, e337.
47. Gutierrez, A., Vicini, J., Patarroyo, M.E., Murillo, L.A., Patarroyo, M.A., 2000. *Plasmodium vivax*: polymorphism in the merozoite surface protein 1 gene from wild Colombian isolates. *Exp Parasitol* 95, 215-219.
48. Hayton, K., Gaur, D., Liu, A., Takahashi, J., Henschen, B., Singh, S., Lambert, L., Furuya, T., Bouttenot, R., Doll, M., Nawaz, F., Mu, J., Jiang, L., Miller, L.H., Wellems, T.E., 2008. Erythrocyte binding protein PfRH5 polymorphisms determine species-specific pathways of *Plasmodium falciparum* invasion. *Cell Host Microbe* 4, 40-51.
49. Herrera, S., Bonelo, A., Perlaza, B.L., Fernández, O.L., Victoria, L., Lenis, A.M., Soto, L., Hurtado, H., Acuña, L.M., Vélez, J.D., Palacios, R., Chen-Mok, M., Corradin, G., Arévalo-Herrera, M., 2005. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in colombian malaria-naive volunteers by a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. *Am J Trop Med Hyg* 73, 3-9.
50. Herrera, S., Bonelo, A., Perlaza, B.L., Valencia, A.Z., Cifuentes, C., Hurtado, S., Quintero, G., López, J.A., Corradin, G., Arévalo-Herrera, M., 2004. Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *Int J Parasitol* 34, 1535-1546.

51. Herrera, S., Fernández, O.L., Vera, O., Cárdenas, W., Ramírez, O., Palacios, R., Chen-Mok, M., Corradin, G., Arévalo-Herrera, M., 2011. Phase I safety and immunogenicity trial of *Plasmodium vivax* CS derived long synthetic peptides adjuvanted with montanide ISA 720 or montanide ISA 51. *Am J Trop Med Hyg* 84, 12-20.
52. Hisaeda, H., Stowers, A.W., Tsuboi, T., Collins, W.E., Sattabongkot, J.S., Suwanabun, N., Torii, M., Kaslow, D.C., 2000. Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. *Infect Immun* 68, 6618-6623.
53. Hoffman, S.L., Goh, L.M., Luke, T.C., Schneider, I., Le, T.P., Doolan, D.L., Sacci, J., de la Vega, P., Dowler, M., Paul, C., Gordon, D.M., Stoute, J.A., Church, L.W., Sedegah, M., Heppner, D.G., Ballou, W.R., Richie, T.L., 2002. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Infect Dis* 185, 1155-1164.
54. Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavanij, S., Schwartz, A.L., Nussenzweig, R.S., 1984. Inhibition of entry of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. *J Immunol* 132, 909-913.
55. Hossain, M.E., Dhawan, S., Mohammed, A., 2012. The cysteine-rich regions of *Plasmodium falciparum* RON2 bind with host erythrocyte and AMA1 during merozoite invasion. *Parasitol Res* 110, 1711-1721.
56. Kantele, A., Jokiranta, T.S., 2011. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clin Infect Dis* 52, 1356-1362.
57. Kappe, S.H., Gardner, M.J., Brown, S.M., Ross, J., Matuschewski, K., Ribeiro, J.M., Adams, J.H., Quackenbush, J., Cho, J., Carucci, D.J., Hoffman, S.L., Nussenzweig, V., 2001. Exploring the transcriptome of the malaria sporozoite stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9895-9900.
58. Kappe, S.H., Noe, A.R., Fraser, T.S., Blair, P.L., Adams, J.H., 1998. A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1230-1235.
59. Kariu, T., Yuda, M., Yano, K., Chinzei, Y., 2002. MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *J Exp Med* 195, 1317-1323.
60. King, C.L., Michon, P., Shakri, A.R., Marcotty, A., Stanisic, D., Zimmerman, P.A., Cole-Tobian, J.L., Mueller, I., Chitnis, C.E., 2008. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8363-8368.

61. Kolaskar, A.S., Tongaonkar, P.C., 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 276, 172-174.
62. Kumar, S., Yadava, A., Keister, D.B., Tian, J.H., Ohl, M., Perdue-Greenfield, K.A., Miller, L.H., Kaslow, D.C., 1995. Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in Aotus monkeys. *Mol Med* 1, 325-332.
63. Lacerda, M.V., Mourao, M.P., Alexandre, M.A., Siqueira, A.M., Magalhaes, B.M., Martinez-Espinosa, F.E., Filho, F.S., Brasil, P., Ventura, A.M., Tada, M.S., Couto, V.S., Silva, A.R., Silva, R.S., Alecrim, M.G., 2012. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar J* 11, 12.
64. Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P.J., Vial, H., Dubremetz, J.F., 2005. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol* 7, 1823-1833.
65. Leite, J.A., Bargieri, D.Y., Carvalho, B.O., Albrecht, L., Lopes, S.C., Kayano, A.C., Farias, A.S., Chia, W.N., Claser, C., Malleret, B., Russell, B., Castiñeiras, C., Santos, L.M., Brocchi, M., Wunderlich, G., Soares, I.S., Rodrigues, M.M., Rénia, L., Costa, F.T., 2015. Immunization with the MAEBL M2 Domain Protects against Lethal *Plasmodium yoelii* Infection. *Infect Immun* 83, 3781-3792.
66. Lin, E., Kiniboro, B., Gray, L., Dobbie, S., Robinson, L., Laumaea, A., Schöpflin, S., Stanistic, D., Betuela, I., Blood-Zikursh, M., Siba, P., Felger, I., Schofield, L., Zimmerman, P., Mueller, I., 2010. Differential patterns of infection and disease with *P. falciparum* and *P. vivax* in young Papua New Guinean children. *PLoS One* 5, e9047.
67. Llanos-Cuentas, A., Lacerda, M.V., Rueangweerayut, R., Krudsood, S., Gupta, S.K., Kochar, S.K., Arthur, P., Chuenchom, N., Möhrle, J.J., Duparc, S., Ugwuegbulam, C., Kleim, J.P., Carter, N., Green, J.A., Kellam, L., 2014. Tafenoquine plus chloroquine for the treatment and relapse prevention of *Plasmodium vivax* malaria (DETECTIVE): a multicentre, double-blind, randomised, phase 2b dose-selection study. *Lancet* 383, 1049-1058.
68. Malkin, E.M., Durbin, A.P., Diemert, D.J., Sattabongkot, J., Wu, Y., Miura, K., Long, C.A., Lambert, L., Miles, A.P., Wang, J., Stowers, A., Miller, L.H., Saul, A., 2005. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* 23, 3131-3138.

69. Marsh, K., Howard, R.J., 1986. Antigens induced on erythrocytes by *P. falciparum*: expression of diverse and conserved determinants. *Science* 231, 150-153.
70. Marsh, K., Kinyanjui, S., 2006. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol* 28, 51-60.
71. Mendis, K., Sina, B.J., Marchesini, P., Carter, R., 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 64, 97-106.
72. Michon, P., Cole-Tobian, J.L., Dabod, E., Schoepflin, S., Igu, J., Susapu, M., Tarongka, N., Zimmerman, P.A., Reeder, J.C., Beeson, J.G., Schofield, L., King, C.L., Mueller, I., 2007. The risk of malarial infections and disease in Papua New Guinean children. *Am J Trop Med Hyg* 76, 997-1008.
73. Michon, P., Stevens, J.R., Kaneko, O., Adams, J.H., 2002. Evolutionary relationships of conserved cysteine-rich motifs in adhesive molecules of malaria parasites. *Mol Biol Evol* 19, 1128-1142.
74. Miller, L.H., Ackerman, H.C., Su, X.Z., Wellems, T.E., 2013. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med* 19, 156-167.
75. Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., Doumbo, O.K., 2002. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415, 673-679.
76. Mitchell, G.H., Thomas, A.W., Margos, G., Dluzewski, A.R., Bannister, L.H., 2004. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect Immun* 72, 154-158.
77. Moon, S.U., Na, B.K., Kang, J.M., Kim, J.Y., Cho, S.H., Park, Y.K., Sohn, W.M., Lin, K., Kim, T.S., 2010. Genetic polymorphism and effect of natural selection at domain I of apical membrane antigen-1 (AMA-1) in *Plasmodium vivax* isolates from Myanmar. *Acta Trop* 114, 71-75.
78. Moreno, A., Caro-Aguilar, I., Yazdani, S.S., Shakri, A.R., Lapp, S., Strobert, E., McClure, H., Chitnis, C.E., Galinski, M.R., 2008. Preclinical assessment of the receptor-binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein as a vaccine candidate in rhesus macaques. *Vaccine* 26, 4338-4344.
79. Mueller, I., Galinski, M.R., Baird, J.K., Carlton, J.M., Kochar, D.K., Alonso, P.L., del Portillo, H.A., 2009. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis* 9, 555-566.
80. Mueller, I., Galinski, M.R., Tsuboi, T., Arevalo-Herrera, M., Collins, W.E., King, C.L., 2013. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. *Adv Parasitol* 81, 77-131.

81. Mueller, I., Shakri, A.R., Chitnis, C.E., 2015. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* 33, 7489-7495.
82. Murray, C.J., Rosenfeld, L.C., Lim, S.S., Andrews, K.G., Foreman, K.J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R., Lopez, A.D., 2012. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* 379, 413-431.
83. Naing, C., Whittaker, M.A., Nyunt Wai, V., Mak, J.W., 2014. Is *Plasmodium vivax* malaria a severe malaria?: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e3071.
84. Nilsson, S.K., Childs, L.M., Buckee, C., Marti, M., 2015. Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. *PLoS Pathog* 11, e1004871.
85. Noe, A.R., Adams, J.H., 1998. *Plasmodium yoelii* YM MAEBL protein is coexpressed and colocalizes with rhoptry proteins. *Mol Biochem Parasitol* 96, 27-35.
86. Ntumngia, F.B., Adams, J.H., 2012. Design and immunogenicity of a novel synthetic antigen based on the ligand domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein. *Clin Vaccine Immunol* 19, 30-36.
87. Nóbrega de Sousa, T., Carvalho, L.H., Alves de Brito, C.F., 2011. Worldwide genetic variability of the Duffy binding protein: insights into *Plasmodium vivax* vaccine development. *PLoS One* 6, e22944.
88. O'Donnell, R.A., Saul, A., Cowman, A.F., Crabb, B.S., 2000. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-119 across distantly related *Plasmodium* species. *Nat Med* 6, 91-95.
89. Ocampo, M., Curtidor, H., Vera, R., Valbuena, J.J., Rodriguez, L.E., Puentes, A., Lopez, R., Garcia, J.E., Tovar, D., Pacheco, P., Navarro, M.A., Patarroyo, M.E., 2004. MAEBL *Plasmodium falciparum* protein peptides bind specifically to erythrocytes and inhibit in vitro merozoite invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 319-329.
90. Oliveira-Ferreira, J., Lacerda, M.V., Brasil, P., Ladislau, J.L., Tauil, P.L., Daniel-Ribeiro, C.T., 2010. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J* 9, 115.
91. Ord, R.L., Rodriguez, M., Lobo, C.A., 2015. Malaria invasion ligand RH5 and its prime candidacy in blood-stage malaria vaccine design. *Hum Vaccin Immunother* 11, 1465-1473.
92. Organization, W.H., 2016. Malaria Vaccine Rainbow Tables.
93. PAHO, WHO, 2014. Report on the Situation of Malaria in the Americas 2014, p. 114.
94. Patarroyo, M.A., Calderón, D., Moreno-Pérez, D.A., 2012. Vaccines against *Plasmodium vivax*: a research challenge. *Expert Rev Vaccines* 11, 1249-1260.

95. Perera, K.L., Handunnetti, S.M., Holm, I., Longacre, S., Mendis, K., 1998. Baculovirus merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant antigens are highly protective in a natural primate model for human *Plasmodium vivax* malaria. *Infect Immun* 66, 1500-1506.
96. Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L., Jarra, W., 2000. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect* 2, 1461-1477.
97. Preiser, P., Renia, L., Singh, N., Balu, B., Jarra, W., Voza, T., Kaneko, O., Blair, P., Torii, M., Landau, I., Adams, J.H., 2004. Antibodies against MAEBL ligand domains M1 and M2 inhibit sporozoite development in vitro. *Infect Immun* 72, 3604-3608.
98. Prudêncio, M., Rodriguez, A., M, M.M., 2006. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage *Nature Reviews Microbiology*, p. 8.
99. Rosa, D.S., Iwai, L.K., Tzelepis, F., Bargieri, D.Y., Medeiros, M.A., Soares, I.S., Sidney, J., Sette, A., Kalil, J., Mello, L.E., Cunha-Neto, E., Rodrigues, M.M., 2006. Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). *Microbes Infect* 8, 2130-2137.
100. Saul, A., Hensmann, M., Sattabongkot, J., Collins, W.E., Barnwell, J.W., Langermans, J.A., Wu, Y., Long, C.A., Dubovsky, F., Thomas, A.W., 2007. Immunogenicity in rhesus of the *Plasmodium vivax* mosquito stage antigen Pvs25H with Alhydrogel and Montanide ISA 720. *Parasite Immunol* 29, 525-533.
101. Siqueira, A.M., Alexandre, M.A., Mourao, M.P., Santos, V.S., Nagahashi-Marie, S.K., Alecrim, M.G., Lacerda, M.V., 2010. Severe rhabdomyolysis caused by *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 83, 271-273.
102. Snounou, G., Singh, B., 2002. Nested PCR analysis of Plasmodium parasites. *Methods Mol Med* 72, 189-203.
103. Snow, R.W., Guerra, C.A., Noor, A.M., Myint, H.Y., Hay, S.I., 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 434, 214-217.
104. Srinivasan, P., Yasgar, A., Luci, D.K., Beatty, W.L., Hu, X., Andersen, J., Narum, D.L., Moch, J.K., Sun, H., Haynes, J.D., Maloney, D.J., Jadhav, A., Simeonov, A., Miller, L.H., 2013. Disrupting malaria parasite AMA1-RON2 interaction with a small molecule prevents erythrocyte invasion. *Nat Commun* 4, 2261.

105. Staden, R., Beal, K.F., Bonfield, J.K., 2000. The Staden package, 1998. *Methods Mol Biol* 132, 115-130.
106. Stowers, A.W., Kennedy, M.C., Keegan, B.P., Saul, A., Long, C.A., Miller, L.H., 2002. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. *Infect Immun* 70, 6961-6967.
107. Takala, S.L., Plowe, C.V., 2009. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'. *Parasite Immunol* 31, 560-573.
108. Tang, J., Dai, Y., Zhang, H., Culleton, R.L., Liu, Y., Zhao, S., Wang, X., Guan, X., Kaneko, O., Zhu, Y., 2012. Positive diversifying selection on *Plasmodium vivax* RON2 protein. *Parasitology* 139, 709-715.
109. Tjitra, E., Anstey, N.M., Sugiarto, P., Warikar, N., Kenangalem, E., Karyana, M., Lampah, D.A., Price, R.N., 2008. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med* 5, e128.
110. Tonkin, M.L., Roques, M., Lamarque, M.H., Pugnère, M., Douguet, D., Crawford, J., Lebrun, M., Boulanger, M.J., 2011. Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science* 333, 463-467.
111. Tuteja, R., 2007. Malaria - an overview. *FEBS J* 274, 4670-4679.
112. Tyler, J.S., Boothroyd, J.C., 2011. The C-terminus of Toxoplasma RON2 provides the crucial link between AMA1 and the host-associated invasion complex. *PLoS Pathog* 7, e1001282.
113. Vanloubbeeck, Y., Pichyangkul, S., Bayat, B., Yongvanitchit, K., Bennett, J.W., Sattabongkot, J., Schaecher, K., Ockenhouse, C.F., Cohen, J., Yadava, A., group, P.v.v.s., 2013. Comparison of the immune responses induced by soluble and particulate *Plasmodium vivax* circumsporozoite vaccine candidates formulated in AS01 in rhesus macaques. *Vaccine* 31, 6216-6224.
114. Versiani, F.G., Almeida, M.E., Melo, G.C., Versiani, F.O., Orlandi, P.P., Mariúba, L.A., Soares, L.A., Souza, L.P., da Silva Balieiro, A.A., Monteiro, W.M., Costa, F.T., del Portillo, H.A., Lacerda, M.V., Nogueira, P.A., 2013. High levels of IgG3 anti ICB2-5 in *Plasmodium vivax*-infected individuals who did not develop symptoms. *Malar J* 12, 294.

115. Vicentin, E.C., Franoso, K.S., Rocha, M.V., Iourtov, D., Dos Santos, F.L., Kubrusly, F.S., Sakauchi, M.A., Raw, I., Nosten, F., Renia, L., Rodrigues, M.M., Russell, B., Soares, I.S., 2014. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 expressed in *Pichia pastoris* yeast. *Infect Immun* 82, 1296-1307.
116. WHO, 2010. Guidelines for the treatment of malaria, 3^a ed.
117. WHO, 2014. World Malaria Report.
118. WHO, 2015. World Malaria Report 2015.
119. WHO, 2016. World Malaria Report 2016.
120. Wiley, S.R., Raman, V.S., Desbien, A., Bailor, H.R., Bhardwaj, R., Shakri, A.R., Reed, S.G., Chitnis, C.E., Carter, D., 2011. Targeting TLRs expands the antibody repertoire in response to a malaria vaccine. *Sci Transl Med* 3, 93ra69.
121. Wu, Y., Ellis, R.D., Shaffer, D., Fontes, E., Malkin, E.M., Mahanty, S., Fay, M.P., Narum, D., Rausch, K., Miles, A.P., Aebig, J., Orcutt, A., Muratova, O., Song, G., Lambert, L., Zhu, D., Miura, K., Long, C., Saul, A., Miller, L.H., Durbin, A.P., 2008. Phase 1 trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide ISA 51. *PLoS One* 3, e2636.
122. Yadava, A., Hall, C.E., Sullivan, J.S., Nace, D., Williams, T., Collins, W.E., Ockenhouse, C.F., Barnwell, J.W., 2014. Protective efficacy of a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-based vaccine in *Aotus nancymae* is associated with antibodies to the repeat region. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e3268.
123. Yadava, A., Sattabongkot, J., Washington, M.A., Ware, L.A., Majam, V., Zheng, H., Kumar, S., Ockenhouse, C.F., 2007. A novel chimeric *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. *Infect Immun* 75, 1177-1185.

9. ANEXOS

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Patogênese de Plasmodium vivax

Pesquisador: Stefanie Costa Pinto Lopes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54234216.1.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.457.458

Apresentação do Projeto:

O Plasmodium vivax é responsável por mais de 80 milhões de casos de malária por ano no mundo, apresentando forte impacto social fora do continente africano, principalmente na Ásia e nas Américas. O Brasil responde por 50-60% do total de casos de malária notificados nas Américas, sendo 85% dessas infecções causadas por P. vivax e com transmissão restrita quase exclusivamente à região Amazônica (99,8%). Achados

anatomopatológicos semelhantes aos que são observados nos casos de P. falciparum foram recentemente constatados em infecções por P. vivax, as quais podem também evoluir para formas graves da doença. Essas observações desafiam a visão pré-estabelecida de que P. vivax é um parasita "benigno". No entanto, a realização de ensaios funcionais para o estudo da patogênese e infectividade de P. vivax permanecem restritos a centros

hospitalares de referência regional em áreas endêmicas. Este fato se deve, principalmente, a impossibilidade de sistema de cultivo de longa duração in vitro que seja confiável e reprodutível. Sendo assim, em parceria com centros hospitalares de referência em áreas endêmicas para malária, fomos capazes de desenvolver ensaio de invasão ex vivo, e mostramos que eritrócitos infectados de P. vivax (Ei-Pv) coletados de pacientes infectados são capazes de aderir ex vivo ao endotélio pulmonar, cerebral e na placenta. Esses achados sugerem a participação desta capacidade adesiva nos

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.457.458

processos patológicos de *P. vivax* nesses órgãos. Baseado na capacidade de campo instalada e no conhecimento já adquirido pretendemos: (i) ampliar a compreensão dos mecanismos de patogênese relacionados à citoadesão e à formação de rosetas de Ei-Pv (ensaios funcionais), (ii) identificar os potenciais ligante(s) parasitários envolvidos (por meio de análises moleculares e geração de anticorpos monoclonais) e (iii) avaliar a participação das plaquetas nesse processo adesivo e seu efeito na geração e amplificação da ativação endotelial na malária por *P. vivax*.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo geral deste subprojeto é investigar detalhadamente o papel de ligantes parasitários e receptores endoteliais envolvidos no processo de sequestro de *P. vivax*, via estudos de formação de rosetas e de citoadesão no endotélio, bem como a análise das potenciais consequências destes fenômenos no hospedeiro. Pretende-se ainda, avaliar a participação das plaquetas e mediadores solúveis no plasma nesse processo adesivo e seu efeito na geração e amplificação da ativação endotelial na malária por *P. vivax*.

Objetivo Secundário:

i. Verificar a existência de desproporção entre diferentes estágios parasitários no sangue periférico de pacientes infectados com *P. vivax* por meio da análise cuidadosa de esfregaços sanguíneos e citometria de fluxo; ii. Determinar a participação no processo citoadesivo e na formação de rosetas de diferentes estágios parasitários (trofozoítas e esquizontes) de Ei-Pv, bem como o grau de envolvimento de células e/ou moléculas (e.g. plaquetas, micropartículas, citocinas, imunoglobulinas, sistema complemento, ADAMTS13 e VWF) presentes no plasma de indivíduos infectados; iii. Verificar a natureza bioquímica (proteica) de antígenos da superfície de Ei-Pv responsáveis pela formação de rosetas por meio de tratamento prévio com enzimas (e.g. condroitinase, hialuronidase, neuroaminidase, tripsina, quimiotripsina, heparinase, etc.), bem como a participação de diferentes grupos sanguíneos (ABO); iv. Realizar ensaios de adesão (estático e fluxo) com Ei-Pv isolados a partir do sangue periférico de pacientes em células endoteliais após diferentes tratamentos enzimáticos (e.g. condroitinase, hialuronidase, etc.) e na presença de CSA e heparan sulfato; v. Avaliar o papel do endotélio, por meio de sua ativação ou não, com moléculas imunostimulatórias (e.g. TNF-, IFN- e LT-), determinando a expressão de potenciais receptores e do grau adesivo de Ei-Pv; vi. Analisar a natureza genética, por meio do sequenciamento do transcrito em plataforma Illumina, de diferentes estágios de Ei-Pv envolvidos,

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.457.458

ou não, na adesão e na formação de rosetas. vii. Caracterização da diversidade genética de diferenças isolados de *P. vivax* coletados em área endêmica da Amazônia, quer por detecção de microssatélites, quer por análise da distribuição de polimorfismos (SNPs). viii. Expressar variantes destas proteínas para avaliação da sua imunogenicidade utilizando um painel de soros de pacientes infectados com *P. vivax* na Amazônia Brasileira.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os únicos riscos aos participantes deste pesquisa são os riscos associados com a coleta de sangue, que incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Cuidados devem ser tomados para minimizar esses riscos.

Benefícios:

O participante não será beneficiado diretamente pela participação neste estudo. Trata-se de um estudo sobre a biologia do *Plasmodium vivax* e imunopatogênese da malária, que gerará resultados a longo prazo. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão contribuir e impactar futuramente o tratamento e desenvolvimento de vacinas e drogas para malária vivax.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A análise do protocolo revelou todos os itens requeridos pela Resolução CNS nº 466 de 2012. Diante do exposto na justificativa apresentada, considera-se o tema de extrema relevância para a saúde pública. Trata-se de pesquisa com cooperação de pesquisadores da UNICAMP, FIOCRUZ e da FMT-HVD, cujo protocolo permitiu comprovar a participação de cada membro da equipe, de adequada capacidade científica. Além disso, observa-se que os benefícios advindos do processo de investigação e dos resultados da pesquisa suplantam seu ônus e potenciais riscos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A análise do protocolo revelou todos os itens requeridos pela Resolução CNS nº 466 de 2012: 1. PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO; 2. Folha de rosto adequadamente preenchida; 3. Projeto detalhado; 4. Carta de anuência da Gerência de Malária da FMT-HVD; 5. TCLE adequadamente redigido; 6. Instrumento de coleta de dados.

Recomendações:

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.457.458

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante da análise do protocolo, este relator não observou nenhuma pendência. Voto pela aprovação do mesmo na sua versão atual.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_558680.pdf	10/03/2016 17:58:29		Aceito
Outros	ANUENCIA.pdf	10/03/2016 17:49:17	João Conrado Khouri dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	10/03/2016 17:46:37	João Conrado Khouri dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	COMITEDEETICA.docx	09/03/2016 14:47:05	Stefanie Costa Pinto Lopes	Aceito
Outros	Questionario.pdf	03/02/2016 13:21:21	Catarina Baeta da Luz Bourgard	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	03/02/2016 13:19:47	Catarina Baeta da Luz Bourgard	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

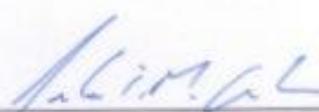
E-mail: cep@fmt.am.gov.br

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E IMUNOGENICIDADE DAS PROTEÍNAS MAEBL E RON2 DE Plasmodium vivax**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 02 de junho de 2017

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Najara Carneiro Bittencourt**
RG n.º 5104834361

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Fabio Trindade Maranhão Costa**
RG n.º 1263942