

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Roberta Reis Soares

**ESTUDO FENOTÍPICO E FUNCIONAL DE POPULAÇÕES DE
CÉLULAS B DE MEMÓRIA DURANTE A FASE AGUDA E
CONVALESCENÇA DE MALÁRIA VIVAX EM PACIENTES
EXPOSTOS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

TESE DE DOUTORADO

Juiz de Fora
2017

ROBERTA REIS SOARES

**ESTUDO FENOTÍPICO E FUNCIONAL DE POPULAÇÕES DE
CÉLULAS B DE MEMÓRIA DURANTE A FASE AGUDA E
CONVALESCENÇA DE MALÁRIA VIVAX EM PACIENTES
EXPOSTOS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, como um dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kézia K. G. Scopel - UFJF

Juiz de Fora
2017

Soares, Roberta Reis.

Estudo fenotípico e funcional de populações de células B de memória durante a fase aguda e convalescença de malária vivax em pacientes expostos na Amazônia Brasileira / Roberta Reis Soares. -- 2017.

200 f. : il.

Orientadora: Kézia Katiani Gorza Scopel

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. Malária. 2. Plasmodium vivax. 3. Memória imunológica. 4. Células B. 5. MBCs atípicas. I. Scopel, Kézia Katiani Gorza, orient.
II. Título.

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta tese de doutorado é utilizar apenas algumas páginas para agradecer a todos que colaboraram do seu modo para concretização deste momento tão gradioso em minha vida pessoal.

Inicio meus agradecimentos a Deus! Pela luz, saúde e força que me proporcionou ao longo dessa jornada. Obrigado por não fazer as minhas vontades, mas sim o que for melhor para mim em cada momento de minha vida.

À minha família, sobretudo minha mãe Rita, vovó Stella, vovô Roberto (*in memorian*), tio/padrinho Paulo Roberto, meu noivo Jaderson e ao mais novo membro da família, o cãozinho Chico. Agradeço muito por compreenderem meus erros e ausências, além de mandarem tanta energia positiva, orações e transmitirem paz. Sem o apoio de cada um de vocês nada teria se concretizado. Neste momento, sinto que todo sacrifício realizado foi válido e certamente será recompensado. Espero trazer muito orgulho para vocês sempre! Amo muito vocês!!!

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Kézia Scopel. Kézia, quando você me apresentou o projeto que desenvolvi nesta tese me senti muito desafiada, no entanto, altamente feliz pela oportunidade incrível de realizar um trabalho de campo tão importante, conhecer a região Amazônica e presenciar ao vivo como um paciente se comporta durante um acesso malárico propriamente dito. Sinto-me muito envaidecida pela confiança depositada em mim. Foram muitos os desafios que você me lançou: meses morando no Acre para realização das coletas, em seguida as idas e vindas para o Rio, muitas leituras de textos, interpretação de dados e escritas. Hoje vejo que esses momentos que estive distante de você foram fundamentais para meu amadurecimento científico. Obrigada por me aplaudir de pé em cada conquista. É um prazer muito grande trabalhar com você!

Agradeço muito à professora Dra. Clarice Abramo, minha orientadora de mestrado. Uma pessoa doce, inteligente e que muito me inspirou ao longo desse período de pós-graduação. Do mesmo modo, sinto que você vibra comigo em cada etapa que prossigo. Meus agradecimentos a você serão eternos! Às professoras Elaine Coimbra e Florence por estarem sempre tão disponíveis, além de proporcionarem conselhos valiosos em vários momentos desta trajetória.

Aos meus companheiros de área endêmica Pablo Secatto, Nathália Lima, Bruna Finco (USP) e Rahel Wampler (Swiss TPH) e a querida Maria Silva. Compartilhamos momentos os quais nunca me esquecerei. Tenho por vocês muito carinho e vejo que nossa amizade permanecerá ao longo dos anos. Ao professor Dr. Marcelo Urbano por disponibilizar gentilmente toda infraestrutura para realização do trabalho de campo referente a este projeto. Aos microscopistas Cleide Nunes, Zilda (SESACRE) e Milton Ferreira (GRS/JF) pelo auxílio na verificação das lâminas. Aos pacientes, os quais confiaram na seriedade desta pesquisa, cedendo seu material biológico mesmo estando em algumas ocasiões em condições mórbidas. Obrigada pela oportunidade de conhecer a cada um de vocês e partilhar comigo um pouco de suas histórias. Vocês são peças-chaves para a obtenção dos achados aqui exibidos.

Agradeço interminavelmente aos membros do Laboratório de Imunoparasitologia da IOC – Fiocruz/RJ, representados pelos pesquisadores Dr. Álvaro Luiz Bertho e Dr. Josué da C. Lima-Júnior, bem como aos seus alunos Clarissa Ferreira, Raquel Ferraz, Rodrigo Nunes e Isabela Soares. Às plataformas tecnológicas de citometria de fluxo - Núcleo de Purificação Celular (Sorting) e de ELISpot e equipe, representados por Alessandro Marins e Rafaela da Veiga. Os conhecimentos que vocês me transmitiram, a amizade, a paciência e o apoio foram fundamentais para que esse estudo se concretizasse com êxito.

Ao Laboratório de Parasitologia da UFJF. Às queridas companheiras de trabalho em especial à Patrícia Almeida, Luciana Antinarelli, Fernanda Valério, Juliane Marinho, Daniela Renhe, Bárbara Carpinter, Carol Brandi, Marina Rocha, Juliana Granato e Stephane Calixto pelos momentos de descontração e desabafos. Ao Senhor Jorge e Leni Solino por toda disponibilidade em ajudar sempre com muito boa vontade. Às técnicas Ivone e principalmente à Cristina, onde além do trabalho surgiu uma agradável amizade.

Ao Laboratório de Malária (LAMAL) do CPqRR – Fiocruz/MG, onde sob supervisão da Dr^a. Luzia H. de Carvalho e auxílio de sua aluna Lara C. Amaral foi realizado a PCR em tempo real para diagnóstico confirmatório da infecção malárica nas amostras pertencentes ao estudo.

Aos professores Dr. Henrique Teixeira, Dr. Gilson Macedo e Dr^a. Clarice Abramo pelas valiosas sugestões concedidas no momento da qualificação de doutorado. Certamente a adoção das mesmas contribuiu para melhor condução dos trabalhos.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PGCBIO) e seus professores, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo fomento a este projeto de pesquisa.

A todos o meu caloroso MUITO OBRIGADA!!!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*
Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A malária constitui um dos maiores problemas de saúde pública mundial, sendo responsável por aproximadamente meio milhão de mortes anuais. Por isso, e devido à crescente resistência dos parasitos aos antimaláricos usuais e aumento do número de casos graves, sobretudo os ocasionados por *P. vivax*, grandes esforços têm sido dispensados no desenvolvimento de vacinas. Até o momento, a única vacina licenciada mostrou-se capaz de conferir algum grau de imunidade contra *P. falciparum*, porém a inabilidade de manutenção de resposta protetora ao longo do tempo tem sido um grande desafio a ser superado. Indivíduos naturalmente expostos à doença desenvolvem graus variados de proteção, que parece ser perdida na ausência de reestímulos. Essas observações apontam para falhas na memória imunológica mediada por células B. No Brasil, onde cerca de 85% dos episódios de malária são atribuídos a *P. vivax*, estudos acerca do desenvolvimento e manutenção de memória imunológica são escassos. O entendimento de fatores que possam modular as respostas imunes durante e após a malária são importantes no desenvolvimento de vacinas. Esse estudo teve como objetivo avaliar aspectos clínicos e hematológicos, verificar a geração e persistência de anticorpos e células B de memória (MBCs) direcionadas aos peptídeos sintéticos (PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808)), bem como à proteína recombinante PvAMA-1_{DII} e averiguar a ocorrência de flutuações no compartimento de células B em indivíduos durante a malária aguda e em 30, 60 e 180 dias decorridos do diagnóstico (convalescença) por *P. vivax*. Os resultados obtidos mostraram que alterações hematológicas ocorreram predominantemente na fase aguda, destacando-se plaquetopenia, linfopenia e leucopenia. Na fase aguda da infecção, indivíduos exibiram MBCs e anticorpos específicos para PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808), bem como para a PvAMA-1_{DII}, os quais persistiram, de maneira geral, por > 180 dias na ausência de reinfeções/recaídas. Não foram observadas associações positivas entre respostas de anticorpos e MBCs ao longo do tempo para todos os antígenos avaliados. Além disso, este estudo corroborou a relação entre exposição/infecção malárica e ocorrência de flutuações no perfil fenotípico de subpopulações de células B no sangue periférico, com destaque para a expansão de imaturas e plasmáticas durante a fase aguda da doença. No tocante às MBCs atípicas, independentemente do grupo avaliado (controles expostos, fase aguda ou convalescença) estas células se encontraram expandidas em relação ao observado em indivíduos não expostos à malária. Os dados desse estudo ainda sugerem que a expansão de células B atípicas observada em indivíduos provenientes de área endêmica é influenciada pela ocorrência de episódios progressos da doença. Estudos posteriores são de fundamental importância para determinar o impacto de tais alterações em estratégias de imunizações voltadas ao combate da malária vivax em populações expostas em regiões de baixa transmissão de malária na Amazônia Brasileira.

Palavras-chaves: Malária; *P. vivax*; memória imunológica; células B; MBCs atípicas.

ABSTRACT

Malaria is one of the greatest public health problems in the world, accounting for approximately half a million annual deaths. Therefore, due to the increasing resistance of the parasites to the usual antimalarials and an increase in the number of severe cases, especially those caused by *P. vivax*, great efforts have been dispensed with in the development of vaccines. To date, the only licensed vaccine has been shown to confer some degree of immunity against *P. falciparum*, but the inability to maintain a protective response over time has been a major challenge to be overcome. Individuals naturally exposed to the disease develop varying degrees of protection, which seems to be lost in the absence of re-stimulation. These observations point to failures in B cells-mediated immune memory. In Brazil, where about 85% of malaria episodes are attributed to *P. vivax*, studies on the development and maintenance of immune memory are scarce. Understanding of factors that can modulate immune responses during and after malaria are important in the development of vaccines. This study aimed to evaluate clinical and hematological aspects, to verify the generation and persistence of antibodies and memory B cells (MBCs) directed to synthetic peptides (PvAMA-1_(S290-K307) and PvMSP-9_(E795-A808)), as well as to the recombinant protein PvAMA-1_{DII} and to investigate the occurrence of fluctuations in the B cell compartment in individuals during acute malaria and at 30, 60 and 180 days after the diagnosis (convalescence) of *P. vivax*. The results showed that hematological alterations occurred predominantly in the acute phase, especially thrombocytopenia, lymphopenia and leucopenia. In the acute phase of infection, individuals exhibited MBCs and antibodies specific for PvAMA-1_(S290-K307) and PvMSP-9_(E795-A808) as well as for PvAMA-1_{DII}, which generally persisted > 180 days in the absence of reinfections/relapses. No positive associations between antibody responses and MBCs over time were observed for all antigens evaluated. In addition, this study corroborated the relationship between exposure/malarial infection and occurrence of fluctuations in the phenotypic profile of B-cell subpopulations in peripheral blood, with emphasis on immature and plasma expansion during the acute phase of the disease. Regarding atypical MBCs, regardless of the group evaluated (exposed controls, acute phase or convalescence), these cells were expanded in relation to that observed in individuals not exposed to malaria. The data from this study still suggest that the expansion of atypical B cells observed in individuals from the endemic area is influenced by the occurrence of previous episodes of the disease. Subsequent studies are of fundamental importance to determine the impact of such changes on immunization strategies aimed at combating vivax malaria in populations exposed in regions of low malaria transmission in the Brazilian Amazon.

Key-words: Malaria; *P. vivax*; immunological memory; B cells; atypical MBCs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transmissão da malária no Brasil.	23
Figura 2. Ciclo dos plasmódios no hospedeiro vertebrado.	27
Figura 3. Mecanismos de ação dos anticorpos na imunidade antimalárica durante o estágio sanguíneo da doença.	33
Figura 4. Estrutura esquemática da proteína AMA-1 de <i>P. vivax</i> (PvAMA-1).	34
Figura 5. Estrutura esquemática da proteína MSP-9 de <i>P. vivax</i> (PvMSP-9).	37
Figura 6. Locais de realização das coletas (Nova Califórnia (RO), Acrelândia e Plácido de Castro (AC)).	53
Figura 7. Imagens das atividades de campo. Unidade Mista de Saúde de Acrelândia, AC (A); Moradia típica da área do estudo (Plácido de Castro, AC) (B); Coleta de sangue em paciente envolvido no estudo (C).	55
Figura 8. Curvas de dissociação do PCR Real-Time.	59
Figura 9. Estratégias utilizadas para análise fenotípica de distintos subtipos de células B via citometria de fluxo.	67
Figura 10. Fluxograma ilustrando a composição dos grupos pertencentes ao estudo	71
Figura 11. Densidade parasitária dos indivíduos com malária vivax aguda. Indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> foram subdivididos em primoinfectados ou relato de ocorrência de episódios de ≥ 1 malárias prévias.	74
Figura 12. Percentual (%) de indivíduos apresentando sintomas comuns à fase eritrocítica da infecção malárica.	75
Figura 13. Níveis de hemoglobina (g/dL) (A) e hematócrito (%) (B) nos grupos de indivíduos de estudo	76
Figura 14. Número absoluto de plaquetas (/mm ³) observado nos grupos avaliados (A). Em (B), os indivíduos agudos subdivididos conforme condição de primoinfectados ou relato de episódios de ≥ 1 malárias prévias.	77
Figura 15. Número absoluto de leucócitos totais (/mm ³) (A), monócitos (/mm ³) (B) e linfócitos (/mm ³) (C).	78
Figura 16. Correlação entre parasitemia (parasitos/mm ³) e número absoluto de plaquetas (/mm ³) durante o episódio agudo de malária vivax.	79

Figura 17. Níveis parasitêmicos apresentados pelos infectados segundo ocorrência de malárias prévias.	91
Figura 18. Imunogenicidade de PvAMA-1 _(S290-K307) e PvMSP-9 _(E795-A808) durante o curso da infecção por <i>P. vivax</i> . Frequência de respondedores. As barras indicam a proporção de amostras respondedoras positivas para cada antígeno no respectivo tempo avaliado (A). Índice de reatividade de respondedores positivos ao longo do curso da infecção por <i>P. vivax</i> (B e C)..	93
Figura 19. Mudanças temporais no índice de reatividade (IR) de IgGs específicas para PvAMA-1 _(S290-K307) (A) e PvMSP-9 _(E795-A808) (B) no plasma dos indivíduos durante o seguimento.....	94
Figura 20. Resposta naturalmente adquirida de MBCs PvAMA-1 _(S290-K307) e PvMSP-9 _(E795-A808) específicas ao longo da infecção por <i>P. vivax</i> . Resposta antígeno-específica dos indivíduos observadas pelo ELISpot foram expressas como ASCs antígeno específicas/10 ⁶ PBMCs (A e B) e percentual (%) de ASCs específicas secretoras de IgG (C e D). Imagens representativas dos experimentos (Meio + FBS 10%); ASCs secretoras de IgG totais; ASCs secretoras de IgG PvAMA-1 _(S290-K307) e PvMSP-9 _(E795-A808) específicas (E)..	96
Figura 21. Mudanças temporais nas frequências de ASCs antígeno específicas para PvAMA-1 _(S290-K307) (A) e PvMSP-9 _(E795-A808) (B) em PBMCs dos indivíduos durante o seguimento.....	97
Figura 22. Associação entre respostas de ELISA e ELISpot para PvAMA-1 _(S290-K307) e PvMSP-9 _(E795-A808)	99
Figura 23. Correlação entre frequências de MBCs e níveis de anticorpos específicos para PvAMA-1 _(S290-K307) e PvMSP-9 _(E795-A808)	100
Figura 24. Imunogenicidade de PvAMA-1 _{DII} durante o curso da infecção por <i>P. vivax</i> . Frequência de respondedores. As barras indicam a proporção de amostras respondedoras positivas no respectivo tempo avaliado (A). Índice de reatividade de indivíduos respondedores positivos ao longo da infecção ocasionada por <i>P. vivax</i> (B). Mudanças temporais no índice de reatividade (IR) de IgGs específicas a PvAMA1 _{DII} no plasma dos indivíduos durante o seguimento (C).	118
Figura 25. Associação entre frequência de indivíduos respondedores e níveis de anticorpos específicos à proteína recombinante PvAMA-1 _{DII} e existência de episódios prévios de malária. Indivíduos durante a fase aguda de malária vivax foram agrupados de acordo com a ocorrência de episódios pregressos de malária.	

Barras indicam a proporção de indivíduos respondedores positivos à proteína PvAMA-1_{DII} (A). Índice de reatividade dos indivíduos respondedores positivos durante a infecção aguda de malária vivax de acordo com a ocorrência de malária prévia declarada (B).. 119

Figura 26. Resposta naturalmente adquirida de MBCs à proteína recombinante PvAMA-1_{DII} ao longo do curso da infecção por *P. vivax*. Resposta antígeno específica dos indivíduos observada pelo ELISpot expressas como ASCs antígeno específicas/10⁶ PBMCs (A) e percentual (%) de ASCs específicas secretoras de IgG (B). Mudanças temporais nas frequências de MBCs PvAMA-1_{DII} específicas (C) em PBMCs dos indivíduos durante o seguimento. Imagens representativas dos experimentos (Meio + FBS 10%); ASCs secretoras de IgG totais; ASCs secretoras de IgG PvAMA-1_{DII} específicas (D)..... 121

Figura 27. Distribuição dos subtipos de células B em indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira.. 125

Figura 28. Perfil representativo dos subtipos de células B em indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira.. 125

Figura 29. Indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira naturalmente expostos aos parasitos também exibiram expansão de MBCs atípicas em seu sangue periférico. Influência da exposição e episódios pregressos de malária na expansão de MBCs atípicas.. 126

Figura 30. Alterações induzidas pelo decorrer do tempo nos subtipos de linfócitos B durante os seis meses de seguimento.. 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores e condições de reação.....	58
Tabela 2. Lista dos anticorpos monoclonais usados na fenotipagem de células B...	64
Tabela 3. Títulos dos anticorpos monoclonais usados na fenotipagem de células B.	65
Tabela 4. Número de amostras após a realização do PCR diagnóstico	72
Tabela 5. Características demográficas da população e histórico de exposição à malária	73
Tabela 6. Características demográficas e histórico de exposição à malária.....	90
Tabela 7. Perfil das respostas de anticorpos de células B de memória aos antígenos de <i>P. vivax</i> em amostras de fase aguda, convalescentes de 60 (“conv 60d”), 180 dias (“conv 180d”) e controlos expostos (CE).	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

7-AAD	<i>7-aminoactinomycin D</i> (7-actinomicina D)
aa	aminoácidos
Acs	Anticorpos
AC	Acre
ADCI	<i>Antibody Dependent Cellular Inhibition</i> (inibição celular dependente de anticorpo)
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> (síndrome da imunodeficiência adquirida)
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i> (fosfatase alcalina)
AMA-1	<i>Apical Membrane Antigen-1</i> (Antígeno 1 de Membrana Apical)
APC	<i>Allophycocyanin</i> (aloficocianina)
APCs	<i>Antigen Presenting Cells</i> (células apresentadoras de antígeno)
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i> (síndrome da angústia respiratória aguda)
ASCs	<i>Antibody Secreting Cells</i> (células secretoras de anticorpos)
BAFF	<i>B-cell activating factor</i> (fator de ativação de células B)
BCIP/NBT	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/ nitro blue tetrazolium</i> (substrato)
BCR	<i>B-cell receptor</i> (receptor de células B)
BD®	Becton Dickinson®
Bm	<i>B mature</i> (célula B madura)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (albumina sérica bovina)
CAM	<i>cellular adhesion molecule</i> (molécula de adesão celular)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (grupamento de diferenciação)
CE	Controle Exposto
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CG	Centro Germinativo
CHMI	<i>Controlled Human Malaria Infection</i> (infecção malárica humana controlada)
CI	<i>Confidence interval</i> (intervalo de confiança)
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
CNE	Controle Não Exposto

CO ₂	Gás carbônico
Conv	Convalescentes
CpG	Oligonucleotídeo rico em repetições citosina-guanina
CPqRR	Centro de Pesquisas René Rachou
CR1	<i>Complement Receptor 1</i> (receptor 1 do complemento)
CSP	<i>Circumsporozoite protein</i> (proteína circunsporozoíto)
CTL®	<i>Cellular Technology Limited</i> ®
DARC	<i>Duffy antigen/chemokine receptor</i> (antígeno Duffy/receptor de quimiocinas)
DBP	<i>Duffy binding protein</i> (proteína de ligação ao Duffy)
DCs	<i>Dendritic cells</i> (células dendrítica)
dL	decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EBA	<i>Erythrocyte Binding Antigen 175</i> (Antígeno-175 de ligação ao eritrócito)
ECD	<i>Electron Coupled Dye</i> (corante acoplador de elétrons)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ensaio de imunoadsorção ligado à enzima)
ELISpot	<i>Enzyme-Linked ImmunoSpot</i> (ensaio de imunoadsorção ligado à enzima em pontos)
EMP-1	<i>Erythrocyte membrane protein-1</i> (proteína 1 de membrana de eritrócitos infectados por <i>P.falciparum</i>)
FcRL	<i>Fc receptor-like</i> (receptores tipo <i>Fc</i>)
FDCs	<i>Follicular dendritic cells</i> (células dendríticas foliculares)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
g	grama
<i>g</i>	gravidade
GLURP	<i>Glutamate-rich protein</i> (proteína rica em glutamato)
GPI	<i>glycosylphosphatidylinositol</i> (glicosilfosfatidilinositol)
GRS	Gerência Regional de Saúde
Hb	hemoglobina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico

HCV	<i>Hepatitis C Virus</i> (vírus da hepatite C)
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> (fator de crescimento de hepatócitos)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)
HRP-II	<i>Histidine-Rich Protein II</i> (proteína II rica em histidina)
Ig	Imunoglobulina
IFN- γ	Interferon- γ
IL	<i>interleukin</i> (interleucina)
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPA	Índice Parasitário Anual
IQR	<i>Interquartile range</i> (intervalo interquartil)
IR	Índice de Reatividade
kDa	quilodáltons
LLPCs	<i>Long Lived Plasma Cells</i> (células plasmáticas de longa vida)
LSP	<i>Long synthetic peptide</i> (peptídeo longo sintético)
MBCs	<i>Memory B cells</i> (células B de memória)
MG	Minas Gerais
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (complexo de histocompatibilidade principal)
mL	mililitro
μg	microgramas
μL	microlitros
mm^3	milímetros cúbicos
MS	Ministério da Saúde
MSP	<i>Merozoite Surface Protein</i> (proteína de superfície do merozoíto)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanogramas
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>Natural killer T</i>
NO	<i>nitric oxide</i> (óxido nítrico)
NUPEP	Núcleo de Pesquisas em Parasitologia
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	<i>O-Phenylenediamine Dihydrochloride</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> (padrões moleculares associados aos patógenos)

Pb	pares de bases
PB	<i>Pacific Blue</i> (azul pacífico)
PB	<i>Peripheral blood</i> (sangue periférico)
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (células mononucleares do sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão salino fosfatado)
PCs	<i>Plasmatic cells</i> (células plasmáticas)
PC-Cy5.5	<i>Pyruvate Carboxylase (PC)-Cyanine 5.5</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PE	<i>Phycoerythrin</i> (ficoeritrina)
PE-Cy7	<i>Phycoerythrin-Cyanine 7</i> (ficoeritrina associada à cianina 7)
pg	picogramas
PLT	Plaquetas
PMI	<i>Prime Meridian Income</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> (Fluoreto de polivinilideno)
RBC	<i>Red Blood Cell</i> (eritrócito)
RBP	<i>Reticulocyte Binding Protein</i> (proteína de ligação ao eritrócito)
RJ	Rio de Janeiro
RO	Rondônia
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (espécies reativas do oxigênio)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTS,S/AS01	Vacina Mosquirix®
SD	<i>Standard Deviation</i> (desvio-padrão)
S.E.M.	<i>Standard Error of Mean</i> (erro padrão da média)
SESACRE	Secretaria de Saúde do Estado do Acre
SFB	Soro Fetal Bovino
SLE	<i>Systemic Lupus Erythematosus</i> (lúpus sistêmico eritematoso)
SLPCs	<i>Small Life Plasmatic Cells</i> (células plasmática de vida curta)
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TA	temperatura ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (receptor de células T)
Tfh	<i>T helper</i> foliculares

TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
TLR	<i>Toll-Like Receptors</i> (receptores do tipo Toll)
T _m	<i>Melting temperature</i> (temperatura de dissociação)
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de necrose tumoral)
TRAP	<i>Thrombospondin-Related Anonymous Protein</i> (proteína anônima relacionada à trombospondina)
Treg	T regulatórias
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UMA	Unidade Mista de Saúde de Acrelândia
UNICEF	<i>United Nations Children's Fund</i> (Fundo das Nações Unidas para a Infância)
UNIFESP	Universidade Federal do Estado de São Paulo
USA	<i>United States of America</i> (Estados Unidos)
USAID	<i>United States Agency for International Development</i> (Agência dos Estados Unidos para o Desenvolvimento Internacional)
USP	Universidade de São Paulo
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
χ^2	qui-quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Situação atual da malária humana	22
1.2 Ciclo biológico dos plasmódios no hospedeiro vertebrado	25
1.3 Imunidade antimalárica	29
1.3.1 Imunidade inata e celular	29
1.3.2 Papel dos anticorpos na imunidade antimalárica	31
1.3.2.1 Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) e Proteína 9 de Superfície de Merozoítos (MSP-9) como alvos para indução de imunidade protetora	33
1.3.2.2 Peptídeos provenientes de PvAMA-1 e PvMSP-9 e imunidade	37
1.3.3 Memória imunológica	39
1.3.3.1 Aquisição e manutenção de MBCs <i>Plasmodium</i> específicas	41
1.3.4 A modulação do perfil fenotípico de células B.....	44
2 JUSTIFICATIVA	49
3 OBJETIVOS	52
3.1 Objetivos específicos	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1 Metodologia geral	53
4.1.1 Área e população de estudo.....	53
4.2 Metodologias destinadas ao objetivo específico 1	56
4.2.1 Diagnóstico laboratorial da infecção por <i>Plasmodium</i>	56
4.2.1.1 Diagnóstico microscópico	56
4.2.1.2 Diagnóstico molecular	56
4.2.1.2.1 Extração de DNA utilizando sangue total	57
4.2.1.2.2 PCR Diagnóstico em tempo real	57
4.3 Metodologias comuns aos objetivos específicos 2 e 3	59
4.3.1 Obtenção de PBMCs.....	59
4.3.2 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e funcionais (ELISpot)	60
4.3.2.1 Antígenos	60

4.3.2.2	Determinação do perfil de IgGs totais <i>Plasmodium</i> -específicas por ELISA	61
4.3.2.3	Ensaio de ELISpot para avaliação da resposta de MBCs.....	62
4.4	Metodologia destinada ao objetivo específico 3	63
4.4.1	Caracterização fenotípica dos subtipos de células B	63
4.5	Análise estatística	65
5	RESULTADOS.....	68
Parte 5.1	Aspectos clínicos e hematológicos durante e após a malária vivax em indivíduos expostos na Amazônia Brasileira	69
5.1.1	Introdução	69
5.1.2	Resultados	70
5.1.2.1	Diagnóstico laboratorial	70
5.1.2.2	Características demográficas da população de estudo e sintomatologia	72
5.1.2.3	Características hematológicas.....	75
5.1.3	Discussão.....	79
Parte 5.2	Anticorpos e células B de memória circulantes de longa duração direcionadas aos antígenos de fase sanguínea de <i>Plasmodium vivax</i> (AMA-1 e MSP-9) em indivíduos expostos em regiões de baixa endemicidade de malária na Amazônia Brasileira	88
5.2.1	Introdução	88
5.2.2	Resultados	90
5.2.2.1	Características dos indivíduos do estudo	90
5.2.2.2	Anticorpos IgG naturalmente adquiridos reconhecendo os peptídeos PvAMA-1 _(S290-K307) e PvMSP-9 _(E795-A808) foram observados por pelo menos 6 meses após a infecção aguda por <i>P. vivax</i>	92
5.2.2.3	Indivíduos expostos na Amazônia Brasileira exibem MBCs específicas para PvAMA-1 _(S290-K307) e PvMSP-9 _(E795-A808)	94
5.2.2.4	Associação entre a resposta de anticorpos e células B de memória ao longo do tempo.....	97
5.2.3	Discussão.....	104

Parte 5.3 Perfil de células B de memória específicas para o Antígeno 1 de Membrana Apical de <i>Plasmodium vivax</i> (PvAMA-1) e cinética de subpopulações de células B em indivíduos da Amazônia Brasileira naturalmente expostos a <i>Plasmodium vivax</i>	114
5.3.1 Introdução	114
5.3.2 Resultados	116
5.3.2.1 Perfil de anticorpos anti-PvAMA-1 _{DII} após a infecção por <i>P. vivax</i> sugere respostas de curta duração	117
5.3.2.2 Indivíduos expostos na Amazônia Brasileira exibem MBCs específicas para PvAMA-1 _{DII} , as quais persistem por longos períodos	119
5.3.2.3 Perfil das subpopulações de células B em indivíduos da Amazônia Brasileira naturalmente expostos a <i>Plasmodium vivax</i>	122
5.3.2.4 Análise longitudinal de subpopulações de B nos distintos pontos do seguimento confirma a expansão de células B imaturas e PCs durante a fase aguda de malária vivax	126
5.3.3 Discussão.....	128
6 DISCUSSÃO GERAL	140
7 CONCLUSÕES	151
REFERÊNCIAS	153
ANEXOS	182
ANEXO A - <i>Cluster of differentiation</i> (CDs)	182
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	183
ANEXO C – Questionários clínicos-epidemiológicos	184
ANEXO D - Delineamento experimental	186
ANEXO E – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas (CEP/UFJF).....	187
ANEXO F – Perfil das respostas de anticorpos de MBCs aos antígenos de <i>P. vivax</i> em amostras de fase aguda, convalescentes de 60 (“conv 60d”), 180 dias (“conv 180d”) e controles expostos (CE).....	189
ANEXO G - Mudanças temporais no índice de reatividade (IR) de IgGs específicas para PvAMA-1 _{DII} , PvAMA-1 _(S290-K307) e PvMSP-9 _(E795-A808)	190

APÊNDICES.....	191
APÊNDICE A – Menção honrosa referente aos resultados da “Parte 2”	191

1 INTRODUÇÃO

1.1 Situação atual da malária humana

Dentre todas as enfermidades que afligem o homem, a malária se destaca como grande problema de saúde pública mundial, apresentando-se como obstáculo ao desenvolvimento social e econômico de nações nas quais ela é endêmica (SACHS e MALANEY, 2002; WHO, 2015). É uma doença parasitária ocasionada por protozoários do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*. Cinco espécies estão associadas a episódios de malária humana: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale* e recentemente *P. knowlesi*, estando este último associado principalmente a casos da doença em primatas não humanos (COX-SINGH et al., 2008). Casos de malária humana causadas por *P. knowlesi* foram inicialmente diagnosticados em certas áreas florestais da região do Sudeste Asiático (JONGWUTIWES et al., 2004; SINGH et al., 2004; COX-SINGH et al., 2008; COX-SINGH e SINGH, 2008; WHITE, 2008). A doença é naturalmente transmitida ao homem através da picada de fêmeas do mosquito vetor do gênero *Anopheles* contendo formas infectantes do parasito (SVS-MS, 2005).

A transmissão da malária ocorre predominantemente em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Estima-se que em 96 países 3,2 bilhões de pessoas encontram-se em risco de serem infectadas e desenvolverem a doença. Em 2015, ocorreram cerca de 214 milhões de casos clínicos e aproximadamente 438 mil mortes atribuídas à malária. Aproximadamente 90% dos óbitos atribuídos à malária incidem no continente africano, sendo que 74% destes ocorrem entre crianças menores de cinco anos de idade (WHO, 2015). *P. vivax* é responsável por apenas 6% dos casos globais de malária, porém, quando se exclui desta análise a África Sub-Saariana, o número de casos atribuídos a essa espécie atinge 51% no mundo e, quando se considera apenas o continente das Américas, sua prevalência alcança 70% (HOWES et al., 2016; WHO, 2015).

Dentre os países endêmicos, a malária apresenta grande impacto em áreas mais pobres e marginalizadas. Isso ocorre devido aos altos riscos associados à

infecção, assim como o baixo acesso aos serviços de prevenção, diagnóstico e tratamento (WHO, 2015). Sendo assim, seu controle é intimamente ligado às melhorias em serviços públicos de saúde, infraestrutura e redução da pobreza (WHO, 2015).

No Brasil, a região Amazônica, que compreende os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão, representa em torno de 60% do território nacional em extensão e abriga cerca de 13,4% da população brasileira, é responsável atualmente por cerca de 99,5% dos casos de malária no país (FERREIRA e CASTRO, 2016) (**Figura 1**).

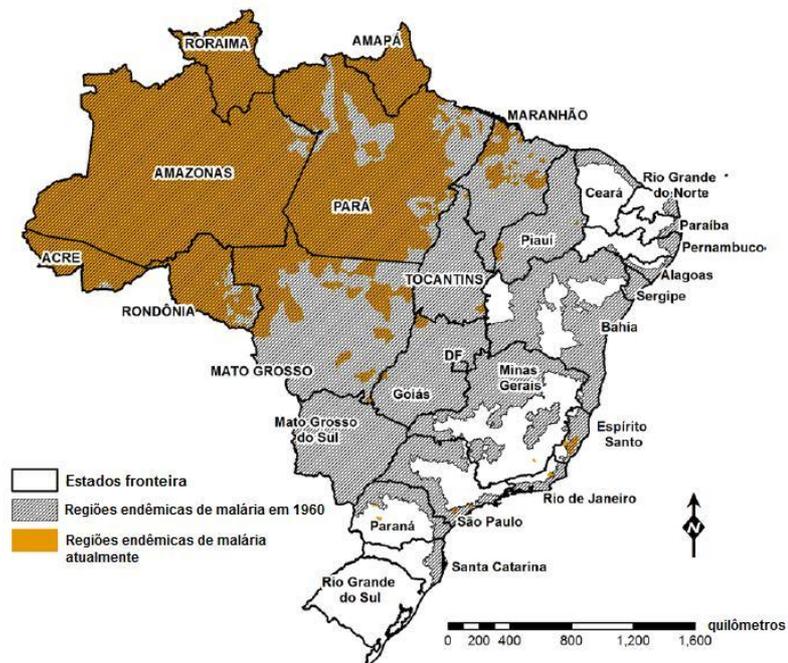


Figura 1. Transmissão da malária no Brasil. Fonte: FERREIRA e CASTRO, 2016. Modificado.

O destaque da região Amazônica como cenário principal da malária no Brasil se explica pela presença de condições naturais favoráveis ao desenvolvimento e manutenção da doença. Este panorama foi iniciado com a ocupação intensificada e desordenada da região, que ocorreu principalmente nas décadas de 70 e 80. Naquela ocasião, residentes nas regiões nordeste, sudeste e sul foram atraídos massivamente para a região norte do país graças aos projetos de colonização, expansão de fronteiras agrícolas, construção de estradas e hidroelétricas e atividades de extração de madeira e mineração (MAHAR, 1979; MARQUES, 1986; BARATA, 1995).

No Brasil, foram registrados durante o ano de 2015, 143 mil casos e 26 mortes atribuídas à malária, sendo estes óbitos ocorridos predominantemente na região extra-amazônica do país (BRASIL-MS, 2016; FERREIRA e CASTRO, 2016). Dos casos registrados, 84% foram ocasionados por *P. vivax* e cerca de 16% por *P. falciparum* (DE PINA-COSTA et al., 2014; WHO, 2015). Fora da região Amazônica, mais de 80% dos casos registrados são importados de estados endêmicos brasileiros e de países vizinhos da América do Sul, América Central, Ásia ou África. Ainda considera-se a existência de uma transmissão residual de malária em estados da região sudeste, já que episódios autóctones de malária foram observados recentemente na região serrana de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro (BRASIL-MS, 2014; SES/RJ, 2015).

Dentre as estratégias públicas atuais de combate à doença no país, destacam-se: a distribuição de mosquiteiros impregnados com inseticidas, borrifação residual domiciliar, controle de criadouros de anofelinos, diagnóstico rápido e tratamento quimioterápico adequado para cada caso (WHO, 2015). No entanto, tem sido observada em âmbito mundial a crescente resistência dos parasitos aos antimaláricos e dos vetores aos inseticidas (TRAPE et al., 2011; PHYO et al., 2012; ASHLEY et al., 2014). Além disso, a ocorrência de casos graves e óbitos, com destaque aos ocasionados por *P. vivax*, relacionado até então apenas a episódios não-complicados da doença (ANSTEY et al., 2012), demonstra que o manejo da malária tem se tornado gradativamente de maior complexidade nos dias atuais.

Sabe-se que, para *P. vivax*, espécie considerada altamente mórbida, existem algumas peculiaridades que a tornam mais refratária às medidas de controle adotadas frequentemente para as demais espécies de *Plasmodium* (MUELLER, SHAKRI e CHITNIS, 2015). Dentre elas, destacam-se: (1) capacidade de formar hipnozoítos dormentes no fígado, o que pode representar uma fonte de novas infecções na ausência de transmissão vetorial (BETUELA et al., 2012; ROBINSON et al., 2015); (2) *P. vivax* é frequentemente associado a infecções assintomáticas e a baixas parasitemias, que geralmente não são detectadas facilmente pelo exame convencional de gota espessa (WHO, 2015); (3) surgimento e maturação precoce dos gametócitos, associado à sua alta infectividade e rápido desenvolvimento no mosquito vetor. Como consequência, *P. vivax* é hoje a espécie de plasmódio que predomina fora do continente Africano (WHO, 2015; revisto por FRANÇA et al., 2016).

Tendo em vista uma série de entraves no combate à malária, a busca por uma vacina têm sido um dos maiores objetivos da comunidade científica atual (DRUILHE e BARNWELL, 2007). Neste sentido, após décadas de esforços, a primeira vacina denominada RTS,S/AS01 (Mosquirix[®], GlaxoSmithKline) - elaborada com base na proteína de superfície de circunsporozoito (CSP) – foi licenciada em 2015. Essa vacina, que é direcionada exclusivamente a infecções causadas por *P. falciparum*, demonstra eficiência contra o desenvolvimento de malária grave de cerca de 50%, quando administrada em crianças de 5-17 meses, e de aproximadamente 30% em crianças de 6-12 semanas (AGNANDJI et al., 2011; AGNANDJI et al., 2012). No entanto, sem reforços, a imunidade induzida é totalmente perdida três anos pós-vacinação (BEJON et al., 2013). Considerando-se, portanto, os reduzidos níveis de proteção conferidos pela RTS,S/AS01 em indivíduos susceptíveis às formas graves de malária e, visto que sua atividade é exclusivamente direcionada a infecções por *P. falciparum* (CHIA et al., 2014), a busca por uma vacina capaz de induzir altos níveis de proteção contra a infecção (independentemente da espécie de parasito) ou que seja eficiente em evitar a progressão da doença ainda justificam os esforços e investimentos nessa área (GOOD et al., 2005; revisto por ENGWERDA et al., 2012). No entanto, é consenso que o sucesso no desenvolvimento de qualquer estratégia vacinal depende, dentre outros fatores, do melhor entendimento das interações entre parasito-hospedeiro e dos mecanismos que possam modular a aquisição e manutenção da imunidade naturalmente adquirida aos plasmódios (RILEY e STEWART, 2013; STANISIC et al., 2013; BOYLE et al., 2016).

1.2 Ciclo biológico dos plasmódios no hospedeiro vertebrado

Os plasmódios possuem um ciclo de vida complexo e que compreende duas fases: uma fase assexuada que se passa no ser humano (**Figura 2**) e outra sexuada, que se passa nas fêmeas do mosquito vetor do gênero *Anopheles*.

O desenvolvimento dos plasmódios no homem se inicia quando, durante o repasto sanguíneo do vetor infectado, os esporozoítos são injetados no tecido subcutâneo, juntamente com a saliva; a qual contém substâncias vasodilatadoras e anticoagulantes. Evidências sugerem que nem toda picada infectante resulta em doença clínica e que alguns esporozoítos são drenados pela circulação linfática,

atingindo o linfonodo mais próximo, onde são encontrados em associação com células dendríticas (MOTA et al., 2001; AMINO et al., 2006). Recentemente, foi proposto que cerca de 10% dos esporozoítos inoculados permanecem e evoluem na pele para trofozoítos. Porém, não está claro se estas formas seriam capazes de iniciar o ciclo sanguíneo (GUEIRARD et al., 2010). Grande parte destes parasitos inoculados na pele é degradada por linfócitos intraepiteliais (SINNIS e ZAFALA, 2008), mas os esporozoítos que atingem a circulação sanguínea podem alcançar o fígado iniciando desta maneira o ciclo hepático.

No fígado, a passagem dos esporozoítos pelas células de Kupffer e endoteliais antes de atingirem definitivamente os hepatócitos, parece ser fundamental para o ciclo de vida dos plasmódios, induzindo a secreção, por parte destas próprias células, de uma citocina pleiotrópica denominada fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) (MOLNARFI et al., 2015), a qual as torna mais susceptíveis à infecção (MOTA et al., 2001; CARROLO et al., 2003). O processo de reconhecimento e invasão da célula hospedeira envolve uma série de interações do tipo ligante-receptor. A principal proteína de superfície dos esporozoítos, a Proteína Circunsporozoito (CSP), se liga aos proteoglicanos dos hepatócitos e esta interação determina a internalização do parasito. Outra proteína que também auxilia no processo de invasão de hepatócitos é Proteína Adesiva Relacionada à Trombospondina (TRAP) (TROTTEIN et al., 1995; KAPPE et al., 2010).

A formação do vacúolo parasitóforo (VP) nos hepatócitos inicia-se com uma junção íntima entre parasito-célula hospedeira, através da qual o parasito se projeta para dentro por meio de uma invaginação da membrana plasmática celular (RENNENBERG et al., 2010). A membrana do VP origina-se inicialmente da membrana plasmática da célula do hospedeiro, mas é rapidamente remodelada pela inserção de proteínas do parasito (CESBRON-DELAUW et al., 2008). A formação do VP é fundamental para proteger o parasito das defesas do indivíduo, permitindo também a aquisição de nutrientes que são fundamentais para seu desenvolvimento (ISET et al., 2011). Uma vez dentro do vacúolo, o parasito se reproduz por esquizogonia, culminando na liberação de milhares de merozoítos dentro de vesículas denominadas merozomas (STURM et al., 2006). Após o rompimento ou dissociação da membrana, os merozoítos hepáticos invadem os eritrócitos e iniciam o estágio sanguíneo, o qual é responsável pelas manifestações clínicas da doença (revisto por PRUDÊNCIO et al., 2008).

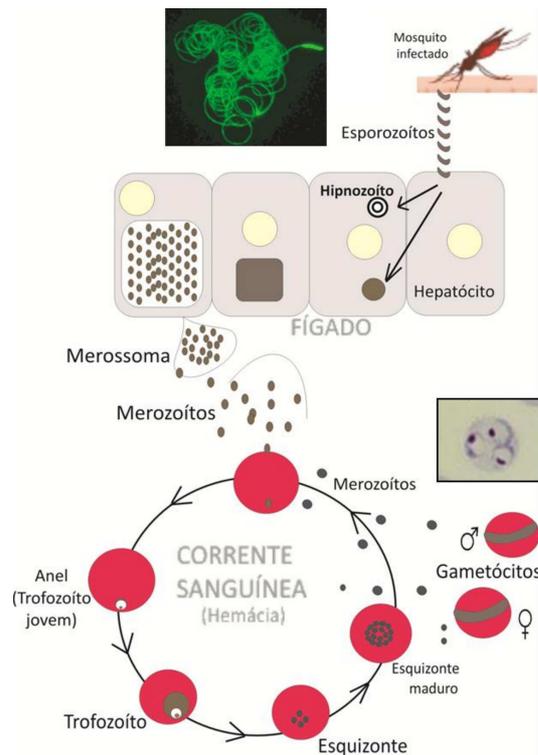


Figura 2. Ciclo dos plasmódios no hospedeiro vertebrado. Fonte: ROWE et al., 2009. Modificado.

O desenvolvimento nas células hepáticas requer, aproximadamente, uma semana para *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para *P. malariae* (KROTOSKI, 1985), sendo completamente assintomático. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, o mosquito vetor inocula distintas populações de esporozoítos, algumas se desenvolvem rapidamente enquanto outras entram em estado de latência no fígado, sendo denominados hipnozoítos (KROTOSKI, 1985). Estes hipnozoítos são os responsáveis pelas recaídas da doença após períodos variáveis de incubação.

A invasão das hemácias pelos merozoítos também é complexa. Enquanto *P. falciparum* utiliza diversos receptores, como moléculas de ácido siálico e glicoforinas A, B e C, além do receptor do complemento 1 (CR1) para adentrar a célula hospedeira, *P. vivax* utiliza o Receptor de Antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) como principal porta de entrada em eritrócitos (MILLER et al. 2002; HANS et al., 2005; LACERDA et al., 2012). Para isso, a proteína de ligação ao Duffy (*Duffy binding protein* - DBP) presente em organelas apicais do merozoíto realiza a interação com o receptor DARC na superfície do reticulócito, precipitando a formação de uma junção necessária para o processo de invasão. A necessidade vital da interação DBP-DARC se mostra evidente uma vez que populações com alta

negatividade de DARC apresentam baixa prevalência de infecções ocasionadas por *P. vivax* (MILLER et al., 1975; MILLER et al., 1976). Apesar disso, estudos recentes apontam evidências de invasão independente de Duffy (Fy), o que indica a existência de vias alternativas de invasão de *P. vivax* aos reticulócitos (CAVASINI et al., 2007; MÉNARD et al., 2010).

Dando continuidade ao orquestrado processo de invasão dos parasitos aos eritrócitos, os baixos níveis de potássio na circulação sanguínea do hospedeiro ativam sinais intracelulares de liberação de cálcio nos plasmódios, que, conseqüentemente, determinam a liberação sequencial de proteínas provenientes de micronemas e roptrias, essenciais no processo de invasão dos parasitos (SINGH et al., 2010). Uma vez ancorado aos eritrócitos, o merozoíto reorienta sua terminação apical para a superfície da hemácia onde é formada uma junção íntima, o que permite a penetração ativa do parasito no eritrócito. Proteínas e lipídeos são liberados das organelas apicais em um “bolso” formado primariamente da membrana do eritrócito invaginada (SUSS-TOBY et al., 1996; GRURING et al., 2011; RIGLAR et al., 2011). Dentro do VP, então, os parasitos se desenvolvem e se multiplicam por reprodução esquizogônica, produzindo, no final deste processo, de 12 a 16 merozoítos por hemácia infectada. Com a maturação completa, os eritrócitos se rompem liberando os merozoítos na circulação sanguínea, que, em seguida, invadem novos eritrócitos reiniciando o ciclo sanguíneo.

As manifestações clínicas da doença surgem nessa etapa do ciclo onde os sintomas clássicos da malária envolvem a tríade febre, calafrio e dor de cabeça. Contudo, sintomas inespecíficos como mal-estar, dor muscular, sudorese, náusea e tontura podem preceder ou acompanhar a tríade sintomática. As manifestações clínicas da malária ocorrem quando substâncias antigênicas ao hospedeiro como a hemozoína (pigmento malárico) e glicosilfosfatidilinositol (GPI) são liberadas na circulação no momento de liberação dos merozoítos. Macrófagos e outras células do hospedeiro são, então, estimulados a produzirem citocinas e outros mediadores que atuam na patologia da infecção (NAIK et al., 2000). Como os parasitos se multiplicam sincronizadamente, se justifica o ciclo de febre que se manifesta a cada 48 horas nas infecções por *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. knowlesi* e a cada 72 horas para *P. malarie* (revisto por ALVES et al., 2007; FRANÇA, et al., 2008).

Após diversos ciclos de replicação, uma pequena proporção de merozoítos eritrocíticos se desenvolve em formas sexuadas, que são os gametócitos femininos

e masculinos. Em infecções por *P. falciparum*, eles são formados mais tardiamente se comparado a *P. vivax* (BRUCE-CHWATT, 1985; PHIMPRAPHI et al., 2008). Ainda não se sabe, ao certo, quais são os estímulos responsáveis pela produção de gametócitos, mas existem duas hipóteses: a primeira sugere que os merozoítos já estão pré-determinados a evoluírem em formas assexuadas ou sexuadas antes de invadirem a hemácia; outra hipótese, ao contrário, sugere que fatores ambientais ou estresse determinem a diferenciação dos merozoítos em gametócitos (DYER e DAY, 2000).

Os gametócitos femininos e masculinos são então ingeridos pela fêmea do mosquito *Anopheles sp.* durante o repasto sanguíneo, dando prosseguimento ao ciclo no hospedeiro invertebrado (BLEDSOE, 2005).

1.3 Imunidade antimalárica

1.3.1 Imunidade inata e celular

Apesar do elevado número de casos mórbidos e de mortes atribuídos anualmente à malária, indivíduos continuamente expostos à infecção em regiões altamente endêmicas, frequentemente desenvolvem graus variados de proteção após múltiplas infecções (MILLER et al., 2002). Contudo, a manutenção da imunidade naturalmente adquirida aos plasmódios parece depender da contínua exposição aos parasitos. Esta imunidade é capaz de suprimir a parasitemia a níveis submicroscópicos, porém, mostra-se incapaz de erradicar completamente a infecção. Por outro lado, as baixas parasitemias parecem ser fundamentais para que a imunidade adquirida seja mantida, prevenindo as manifestações clínicas mais graves da doença (DOOLAN et al., 2009). Realmente, em áreas endêmicas, crianças com infecção patente, porém assintomáticas, têm menor chance de desenvolverem a doença clínica (CROMPTON et al., 2008; MALES et al., 2008). No mesmo sentido, existem relatos de que indivíduos clinicamente imunes que deixam a área endêmica durante longos períodos perdem, com o cessar da exposição, a proteção previamente adquirida, o que os torna novamente susceptíveis à doença clínica (revisto por STRUIK e RILEY, 2004).

Em indivíduos não previamente expostos, a resposta imune inata representa a primeira linha de defesa contra os plasmódios, contribuindo para o controle inicial

da infecção antes do desenvolvimento da imunidade adaptativa (FELL e SMITH, 1998, STEVENSON e RILEY, 2004). A imunidade inata configura uma complexa interação entre parasitos e diversos componentes do sistema imunológico como células dendríticas (DCs), monócitos/macrófagos, além de células “natural killers” (NK), “natural killers T” (NKT) e linfócitos $T\gamma\delta$. O reconhecimento de antígenos solúveis e/ou insolúveis, tais como hemozoína e GPI, por receptores presentes em células do sistema imunológico do hospedeiro determinam a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-12 e IFN- γ e espécies reativas do oxigênio (ROS) e nitrogênio (NO) que atuarão na primeira linha de combate contra os parasitos durante a primoinfecção (URBAN et al., 1999; ARTAVANIS-TSAKONAS e RILEY, 2002; STEVENSON e RILEY, 2004; COBAN et al., 2005; KRISHNEGOWDA et al., 2005).

Apesar da resposta pró-inflamatória ser fundamental para controle da multiplicação do parasito, quando exacerbada, ela pode contribuir, juntamente com outros fatores, para o agravamento da doença (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2003; STEVENSON et al., 2011). Por outro lado, o aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β estão associados à sintomatologia mais branda da infecção (RILEY et al., 2006). Sendo assim, para a eficaz resolução/controle da infecção malárica, é de fundamental importância o balanço adequado entre respostas pró e anti-inflamatórias a fim de se eliminar o parasito sem causar danos ao hospedeiro (LANGHORNE et al., 2004; GONÇALVES et al., 2012; revisto por FROSCH e JONH, 2012).

À imunidade inata segue-se o estabelecimento da imunidade adaptativa, caracterizada pelas respostas imune humoral e celular, onde anticorpos e células T atuam em íntima colaboração no combate à infecção (BULL et al., 1998; GOOD et al., 1998; HISAEDA et al., 2005, PLEASS e HOLDER, 2005; SCHOFIELD e MUELLER, 2006). Células T medeiam proteção em diversas etapas do ciclo de vida dos parasitos. Na etapa pré-eritrocítica, destacam-se linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos que, quando ativados, podem lisar hepatócitos parasitados pela exocitose de grânulos contendo perforina e granzimas (revisto por TRAPANI e SMYTH, 2002). Além disso, pode ocorrer a expressão de FasL (CD95L) nestes linfócitos que, ao interagir com a molécula Fas (CD95) dos hepatócitos pode induzir a apoptose das células alvo (revisto por HARTY et al., 2000). Outro mecanismo utilizado por tais linfócitos é a destruição de parasitos intracelulares mediada por IFN- γ (POMBO et

al., 2002; LUNDIE et al., 2008; IMAI et al., 2010; TSE et al., 2011). No estágio eritrocítico, como hemácias não expressam MHC de classe I, estudos em modelo murino de infecção por *P. yoelii* 17XL propõem que APCs sejam capazes de fagocitar eritrócitos infectados, fazendo a apresentação cruzada de antígeno aos T CD8⁺, promovendo desta maneira o controle da parasitemia sanguínea (IMAI et al., 2010). Linfócitos T CD4⁺ destacam-se em funções efetoras como produção de citocinas, co-estimuladores de células B, participação no processo de desenvolvimento de memória humoral e indução da produção de anticorpos em resposta aos antígenos timo-dependentes (GRUN e WEIDANZ, 1983; BRAKE et al., 1988; TAYLOR-ROBINSON et al., 1993; FELL, CURRIER e GOOD, 1994; AMANTE e GOOD, 1997; POMBO et al., 2002; ELLIOTT et al., 2005; STANISIC et al., 2013; WYKES et al., 2014). No entanto, apesar do indiscutível papel da imunidade inata e celular na defesa antimalárica, sabe-se que anticorpos funcionais destacam-se no combate aos parasitos durante a fase sanguínea da doença (revisto por WIPASA et al., 2002; BEESON et al., 2008; BEESON et al., 2016).

1.3.2 Papel dos anticorpos na imunidade antimalárica

O papel dos anticorpos na imunidade antimalárica foi elegantemente descrito em estudos de transferência passiva como os realizados por Cohen e colaboradores (1961), onde imunoglobulinas de indivíduos adultos clinicamente imunes para *P. falciparum*, quando transferidas para crianças com malária aguda, permitiam o controle da parasitemia e amenizavam os sintomas da doença (COHEN et al., 1961). O papel protetor dos anticorpos foi confirmado décadas seguintes, em um experimento onde IgG purificadas de adultos africanos quando administradas via intravenosa a pacientes adultos da Tailândia infectados por *P. falciparum* determinaram redução profunda da parasitemia e melhoria significativa dos sintomas (SABCHAREON et al., 1991). Subclasses citofílicas de IgG, representadas por IgG1 e IgG3 (DRUILHE e KHUSMITH, 1987; LUNEL e DRUILHE, 1989), mostraram-se particularmente importantes neste processo (TAYLOR-ROBINSON et al., 1995; TONGREN et al., 2006; NEBIE et al., 2008; STANISIC et al., 2009).

Após esses estudos, o entendimento dos mecanismos pelos quais os anticorpos atuam passaram a nortear muitas pesquisas, mas os mesmos ainda não são completamente compreendidos (BOYLE et al., 2016). Sabe-se que, durante o

estágio sanguíneo da doença, anticorpos direcionados aos antígenos de merozoítos podem inibir a invasão destes aos eritrócitos, assim como atrasar seu desenvolvimento intraeritrocítico (O'DONNELL et al., 2001; PERSSON et al., 2008; PERSSON et al., 2013) (**Figura 3**). A opsonização dos merozoítos, assim como de eritrócitos infectados para promoção da fagocitose também é relatada. Neste processo, IgG1 e IgG3 “revestem” os parasitos, culminando na fagocitose destes por células fagocíticas ativadas, via receptor FcRs (*Fc Receptors*) (PERRAUT et al., 1995; revisto por WIPASA et al., 2002). O sistema complemento também pode ser recrutado pelos anticorpos para realização de fagocitose por opsonização, além de promover quimiotaxia e lise celular. Em um estudo recente, foi demonstrado que anticorpos humanos tais como IgG1, IgG3 e IgM, naturalmente adquiridos ou induzidos por candidatos vacinais, são capazes de se ligarem à superfície de merozoítos, e desta maneira, fixar o primeiro subcomponente do complexo C1 (C1q) da via clássica de ativação do sistema complemento, culminando na inibição da invasão e lise dos merozoítos (BOYLE et al., 2015). Outro mecanismo funcional importante na defesa antimalárica é a inibição celular dependente de anticorpo (*antibody-dependent cellular inhibition* - ADCI), que se refere à cooperação entre imunoglobulinas IgG citofílicas e os monócitos/macrófagos na função de inibir o desenvolvimento intraeritrocítico dos parasitos. A atividade inibitória característica deste processo é mediada por fatores solúveis, tais como TNF- α , liberados por estes fagócitos expostos aos merozoítos e imunocomplexos (BOUHAROUN-TAYOUN et al., 1995).

Anticorpos direcionados aos antígenos presentes na superfície de eritrócitos infectados tais como PfEMP-1 (*P. falciparum erythrocyte membrane protein-1*) podem, do mesmo modo, bloquear a ligação destes aos receptores presentes nas células endoteliais do hospedeiro - tais como as moléculas de adesão celular (*cell adhesion molecule* – CAM) representadas por ICAM-I (intercelular), VCAM-I (vascular), sulfato de condroitina A (*Chondroitin sulfate A* – CSA) e o receptor de varredura CD36; promover opsonização para fagocitose, fixar fatores do complemento, assim como inibir a formação das “rosetas” (aglomerados compostos de hemácias parasitadas e não parasitadas). É importante salientar que as imunoglobulinas também podem neutralizar toxinas parasitárias tais como hemozoína e GPI, além de atuarem na etapa pré-eritrocítica, bloqueando tanto a invasão de esporozoítos aos hepatócitos (revisto por DUPS, PEPPER e

COCKBURN, 2014), quanto a transmissão das formas sexuadas dos plasmódios ao mosquito vetor (RILEY et al., 1995; CHAN, FOWKES e BEESON, 2014).

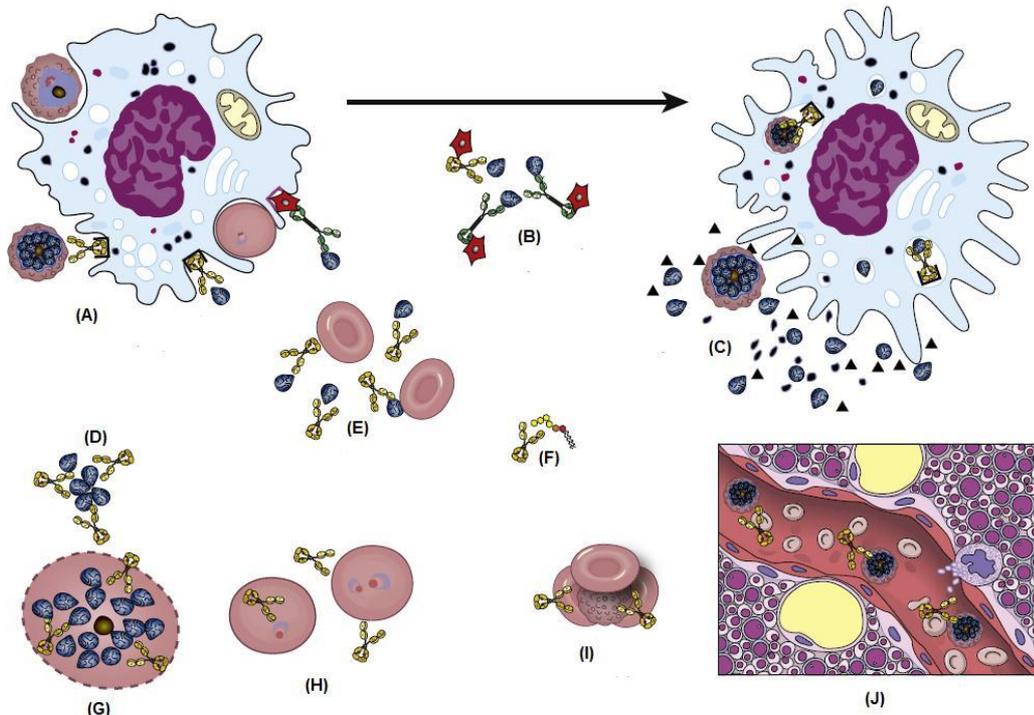


Figura 3. Mecanismos de ação dos anticorpos na imunidade antimalárica durante o estágio sanguíneo da doença. Anticorpos contra merozoítos podem promover opsonização dos parasitos para captação por células fagocíticas (A); fixar o complemento para promover a lise dos merozoítos (B); estimular monócitos/macrófagos a liberarem moléculas capazes de matar os parasitos no interior de eritrócitos infectados (ADCI) (C); impedir a invasão de merozoítos aos eritrócitos (D); inibição da invasão, ligação e processamento (E); neutralização de toxinas (F); prevenir a ruptura dos eritrócitos infectados contendo esquizontes (G); inibir o crescimento dos parasitos no interior das hemácias (H); inibir a formação das rosetas (I) e prevenir a citoaderência dos eritrócitos infectados ao endotélio (J). Fonte: TEO et al., 2016.

Considerando a importância da imunidade humoral no combate à infecção plasmodial, o desenvolvimento de vacinas antimaláricas baseadas na indução da produção de anticorpos têm sido, há décadas, um dos grandes objetivos da comunidade científica. Para tal, é fundamental a identificação de antígenos, com bom potencial imunogênico, capazes de estimular a geração e manutenção de anticorpos protetores por longos períodos (revisito por CHIA, GOH e RÉNIA, 2014).

1.3.2.1 Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) e Proteína 9 de Superfície de Merozoítos (MSP-9) como alvos para indução de imunidade protetora

Sabe-se que o genoma de *P. vivax* é codificado por mais de 5000 genes (AURRECOECHEA et al., 2009). Antígenos de *Plasmodium* localizados em

organelas apicais ou na superfície de merozoítos têm sido frequentemente caracterizados como alvos para indução de imunidade e, conseqüentemente, têm sido indicados como possíveis candidatos a compor vacinas antimaláricas (GOOD et al., 2005).

Neste contexto, o Antígeno 1 de Membrana Apical (*Apical Membrane Antigen* – AMA-1) se destaca como um dos mais importantes candidatos vacinais contra parasitos de fase sanguínea de *P. vivax* (**Figura 4**). É uma proteína integral de membrana do tipo I de 83-kDa, sintetizada por estágios sanguíneos maduros do parasito e também por esporozoítos (NARUM e THOMAS, 1994; SILVIE et al., 2004) e armazenada, inicialmente, nos micronemas (KOCKEN et al., 2002; FENG et al., 2005). Antes da invasão dos merozoítos nos eritrócitos, AMA-1 é processada em um produto de 66-kDa e então liberada na superfície do merozoíto momentos antes ou durante o processo de invasão (NAIR et al., 2002; PIZARRO et al., 2005).

AMA-1 é composta por uma região N-terminal onde possui um peptídeo sinal (42 aa) e uma porção C-terminal, onde se localizam as regiões transmembrana e citoplasmática (50 aa) e um ectodomínio rico em cisteínas. O ectodomínio é formado basicamente por três domínios distintos, sendo que o domínio I (DI) (43-248 aa) possui três pontes dissulfeto, o DII (249-385 aa) possui duas e o DIII (386-487 aa) possui três pontes dissulfeto (HODDER et al., 1996; SILVIE et al., 2004; PIZARRO et al., 2005). Diversos estudos apontam o DII como o mais conservado dentre os demais domínios de AMA-1 (CHESNE-SECK et al., 2005; PUTAPORNTIP et al., 2009), sendo também a região de maior imunogenicidade para *P.falciparum* (LALITHA et al., 2004) e *P.vivax* (MÚFALO et al., 2008; BUENO et al., 2011).

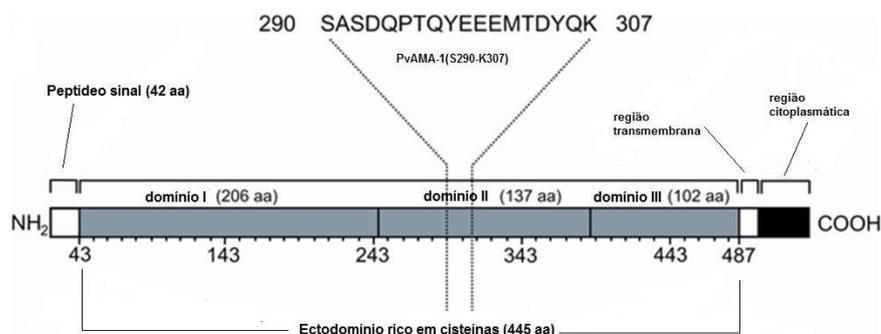


Figura 4. Estrutura esquemática da proteína AMA-1 de *P. vivax* (PvAMA-1). Fonte: BUENO et al., 2011. Modificado. aa = aminoácidos.

A função desta proteína não está completamente esclarecida, porém, seu papel nos processos de invasão dos merozoítos aos eritrócitos já foi previamente elucidado (TRIGLIA et al., 2000; FRASER et al., 2001; DUTTA et al., 2003; MITCHELL et al., 2004). Estudos demonstram que os anticorpos anti-AMA-1 são capazes de inibir a interação dos merozoítos com os eritrócitos (TRIGLIA et al., 2000), bem como dos esporozoítos com os hepatócitos, sugerindo que esta proteína tenha papel importante durante o processo de invasão às células hepáticas (SILVIE et al., 2004). A inclusão da proteína AMA-1 de distintas espécies de *Plasmodium* como candidato vacinal é evidenciada em estudos conduzidos em modelos experimentais (ANDERS et al., 1998; STOWERS et al., 2002), assim como na malária humana, onde grande proporção de indivíduos expostos em distintas áreas endêmicas de malária no mundo, incluindo o Brasil, Sri Lanka e Irã, apresentam resposta naturalmente induzidas de células T e anticorpos específicos direcionados à esta proteína (UDHAYAKUMAR et al., 2001; POLLEY et al., 2004; RODRIGUES et al., 2005; MORAIS et al., 2006; WICKRAMARACHCHI et al., 2006; BARBEDO et al. 2007; MÚFALO et al., 2008; SETH et al., 2010; BUENO et al., 2011; DIAS et al., 2011; ZAKERI et al., 2013; SÁNCHEZ-ARCILA et al., 2015).

Em modelos experimentais, a vacinação de primatas com AMA-1 de *P.knowlesi* e de camundongos com a mesma proteína oriunda de *P.chabaudi* e *P.yoellii yoellii* demonstrou induzir anticorpos específicos capazes de conferir proteção satisfatória em desafios com formas sanguíneas dos parasitos (DEANS et al., 1988; CREWETHER et al., 1996; AMANTE et al., 1997; ANDERS et al., 1998; NARUM et al., 2000; XU et al., 2000). Anticorpos monoclonais gerados contra PK66, homóloga à proteína AMA-1 de *P. knowlesi*, foram capazes de inibir a invasão de merozoítos *in vitro* (THOMAS et al., 1984; KOCKEN et al., 2000). Além disso, a transferência passiva de anticorpos policlonais AMA-1 específicos para camundongos infectados por *P. chabaudi* reduzem a multiplicação dos plasmódios, prevenindo a ocorrência de hiperparasitemias (ANDERS et al., 1998).

Em humanos, a presença de anticorpos naturalmente adquiridos contra o ectodomínio de PfAMA-1 demonstrou forte associação com proteção contra a aquisição de malária falciparum. Indivíduos adultos do Kênia que se apresentaram responsivos à PfAMA-1 mostraram-se protegidos por, pelo menos, seis meses contra aquisição da doença (POLLEY et al., 2004). No Brasil, onde infecções maláricas são majoritariamente ocasionadas por *P. vivax*, dados

soroepidemiológicos obtidos de infecções naturais em indivíduos com distintos níveis de exposição à doença, demonstram que a prevalência e os níveis de IgG anti-PvAMA-1 aumentaram de acordo com a exposição em áreas endêmicas (MORAIS et al., 2006). Além disso, foi observada elevada prevalência, bem como, longa duração na produção de anticorpos específicos, mesmo na ausência de contínua re-exposição aos parasitos (RODRIGUES et al., 2005; MORAIS et al., 2006; BARBEDO et al., 2007; MÚFALO et al., 2008; BUENO et al., 2011; SÁNCHEZ-ARCILA et al., 2015). Anticorpos anti-AMA-1 em populações naturalmente expostas são predominantemente do tipo IgG1, com alguma presença de IgG3; níveis elevados de IgG2 ou IgG4 raramente são observadas (revisito por REMARQUE et al., 2008).

Outra proteína que tem sido alvo recente de pesquisas e que tem demonstrado resultados promissores é a Proteína 9 de Superfície de Merozoítos (*Merozoite Surface Protein-9* - MSP-9) (**Figura 5**). É uma proteína expressa durante a esquizogonia e se associa à superfície dos merozoítos durante o período de desenvolvimento dos esquizontes (BARNWELL et al., 1999). MSP-9 foi inicialmente identificada em *P. falciparum* como um antígeno repetitivo básico-acídico (*acidic basic repeat antigen* - ABRA/PfMSP-9) e, em seguida, genes ortólogos foram identificados em outras espécies de *Plasmodium* (BARNWELL et al., 1999; VARGAS-SERRATO et al., 2003; LOPERA-MESA et al., 2008).

PvMSP-9 é descrita como uma proteína hidrofílica, composta de peptídeo sinal (20 aa) e um grupamento de 4 cisteínas localizadas em região N-terminal longa, conservada e não-repetitiva (PvMSP-9NT) e região C-terminal contendo blocos de repetições *in tandem* espécie-específicas (BARNWELL et al., 1999; VARGAS-SERRATO et al., 2003). Na região N-terminal, cinco epítomos de células T (pE, pJ, pK, pH e pL), são reconhecidas por moléculas do HLA de classe II de humanos (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004; LIMA-JÚNIOR et al., 2012). Com relação à região C-terminal, respostas imunes naturalmente adquiridas confirmaram a presença de blocos altamente imunogênicos, representados por PvMSP9-RI (729-873 aa) e RII (874-972) (LIMA-JÚNIOR et al., 2008). Observações apontam que níveis de IgGs anti-PvMSP-9-RII e PvMSP-9-RIRII exibiram correlação direta com o tempo de exposição dos indivíduos em áreas endêmicas (LIMA-JÚNIOR et al., 2008). A predominância de anticorpos citofílicos IgG1 direcionados às proteínas PvMSP9-NT e PvMSP9-RIRII sugerem o papel protetor destes anticorpos, os quais

podem contribuir no processo de eliminação das formas sanguíneas de *P. vivax* por meio de ADCl e fixação do complemento, por exemplo (LIMA-JÚNIOR et al., 2008).

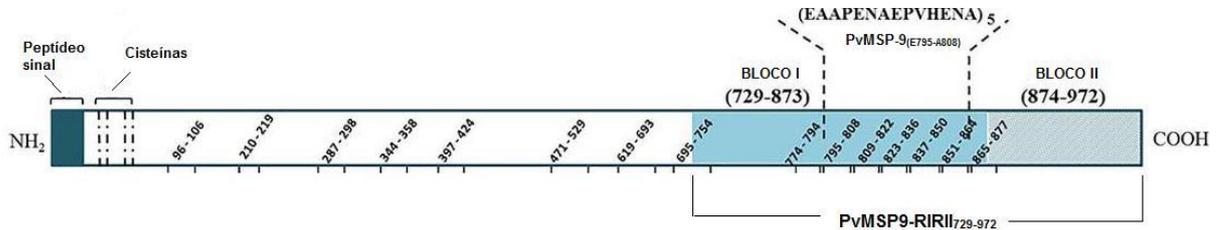


Figura 5. Estrutura esquemática da proteína MSP-9 de *P. vivax* (PvMSP-9). Fonte: RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2016. Modificado.

Em camundongos, a imunização com as proteínas PvMSP-9NT e PvMSP-9RII foram capazes de estimular resposta imune humoral e celular, com indução de altos títulos de anticorpos específicos, os quais demonstraram reatividade a PvMSP-9 nativa do parasito (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004). Além disso, a imunização destes roedores com a proteína PbMSP-9NM demonstrou proteção em desafios futuros contra parasitos de fase sanguínea (LOPERA-MESA et al., 2008). Interessantemente, anticorpos contra as regiões N e C-terminais de PfMSP-9 foram capazes de reduzir o crescimento de *P. falciparum in vitro* (KUSHWAHA et al., 2001). No entanto, apesar destes animadores resultados, obtidos a partir de experimentos conduzidos em modelos experimentais e em humanos, poucos estudos avaliaram o potencial de MSP-9 como candidato vacinal (LOPERA-MESA et al., 2008).

1.3.2.2 Peptídeos provenientes de PvAMA-1 e PvMSP-9 e imunidade

Na busca por um bom candidato vacinal, a maioria dos estudos têm utilizado proteínas recombinantes em inquéritos soropidemiológicos. No entanto, a produção destas proteínas apresenta alguns obstáculos como custos elevados, longo tempo para obtenção, dificuldade de produção em larga escala, possível contaminação biológica, dentre outros fatores (SOARES e RODRIGUES et al., 1998; HERRERA et al., 2004). Assim, recentemente, têm-se buscado cada vez mais o emprego de estratégias alternativas em relação ao uso da vacinologia convencional. Neste sentido, destaca-se a vacinologia reversa (revisto por RAPPUOLI, 2000; RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2016). Por meio dessa estratégia, através do uso de ferramentas de bioinformática (*in silico*), são preditos epítomos lineares a partir

de regiões imunogênicas curtas e específicas presentes na estrutura de importantes candidatos vacinais (BUENO et al., 2011). Os peptídeos, compostos de sequências curtas de aminoácidos, são então, sintetizados quimicamente, purificados e confirmados em relação a sua estrutura química. A seguir, a imunogenicidade do mesmo deverá ser validada através do reconhecimento pelas imunoglobulinas plasmáticas específicas presentes em indivíduos naturalmente expostos à malária. O intuito da vacinologia reversa consiste na possível utilização futura destes peptídeos como estratégia para indução de proteção em indivíduos não imunes à doença (HERRINGTON et al., 1987; ZAFALA et al., 1987).

Neste propósito, Bueno e colaboradores (2011) identificaram um epítipo linear de células B, presente no domínio II (DII) da proteína PvAMA-1, representado pela sequência SASDQPTQYEEEMTDYQK. O peptídeo linear composto por 18 aminoácidos, denominado PvAMA-1_(S290-K307), foi sintetizado para, posteriormente, ter sua antigenicidade confirmada, utilizando-se, para tal, soro de indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira naturalmente infectados por *P. vivax*, os quais, eram sabidamente reativos apenas ao ectodomínio de PvAMA-1, apenas ao DII ou reativos à ambos (PvAMA-1/DII). Foi observado que todas as amostras responsivas ao DII ou à PvAMA-1/DII também reconheciam o peptídeo. No entanto, apenas 58,3% das amostras capazes de reconhecer o ectodomínio também eram responsivas à PvAMA-1_(S290-K307). Além disso, após a depleção de anticorpos específicos ao peptídeo sintético em questão, a prevalência de IgGs capazes de reconhecer PvAMA-1 e DII foram de 18% e 33%, respectivamente. Os resultados alcançados sugerem que o peptídeo PvAMA-1_(S290-K307) pode ser altamente imunogênico durante infecções naturais humanas, sugerindo um possível uso do mesmo em estudos pré-clínicos (BUENO et al., 2011).

No mesmo contexto, Rodrigues-da-Silva e colaboradores (2016) identificaram um epítipo linear antigênico para células B presente na região C-terminal da proteína PvMSP-9 (PvMSP9-RIRII₇₂₉₋₉₇₂), caracterizado pela sequência EAAPENAEPVHENA. Este peptídeo, composto por 14 aminoácidos, foi então nomeado PvMSP-9_(E795-A808). Posteriormente, o grupo validou o potencial imunogênico deste peptídeo, através do reconhecimento por meio de anticorpos plasmáticos específicos presentes em indivíduos naturalmente expostos à malária na Amazônia Brasileira (RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2016). Nesta ocasião, foi observado que 58% dos indivíduos expostos (89% destes não infectados no

momento da coleta da amostra plasmática e 84% relatando episódios prévios de malária), eram responsivos à proteína recombinante PvMSP9-RIRII₇₂₉₋₉₇₂. Destes indivíduos, 56% também respondiam ao peptídeo sintético. Além disso, foi observada a correlação entre os IR de anticorpos anti-PvMSP9-RIRII₇₂₉₋₉₇₂ e PvMSP-9_(E795-A808). Em síntese, os resultados obtidos confirmaram o potencial imunogênico de PvMSP-9_(E795-A808) e apontaram uma possível utilização futura do mesmo para compor vacinas de subunidades (RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2016).

Embora tenham sido encontrados resultados promissores nos estudos acima descritos, é importante destacar que uma das limitações relacionada ao uso de peptídeos sintéticos refere-se ao baixo grau de imunogenicidade. Dentre as causas associadas a este fenômeno está a sua rápida degradação ou excreção *in vivo*, o que torna fundamental o emprego de modificações químicas a fim de se aumentar a estabilidade. Além disso, apenas epítomos lineares podem ser utilizados como vacinas, embora as respostas de anticorpos sejam direcionadas geralmente aos epítomos conformacionais. Por causa disso, candidados vacinais são elaborados geralmente a partir de uma mistura de peptídeos sintéticos polimerizados (RAMESH, 2017). Ressalta-se que, para o sucesso do uso de peptídeos sintéticos, é de fundamental importância, tanto a identificação precisa do epítomo que induz a resposta protetora, quanto a posterior confirmação de seu potencial imunogênico através de estudos soroepidemiológicos (RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2016).

1.3.3 Memória imunológica

Memória imunológica pode ser definida como a capacidade do sistema imune responder de maneira rápida e robusta a um antígeno, sendo propriedade fundamental da resposta imune adaptativa e a base para a elaboração de vacinas eficazes (WEISS et al., 2009). Para a maior parte destas vacinas, anticorpos são fundamentais no desenvolvimento da resposta imune protetora (PLOTKIN, 2008), o que torna os mecanismos que envolvem a geração e manutenção da memória humoral de particular interesse (CROMPTON et al., 2009).

A imunidade humoral de longa duração é mediada por anticorpos pré-formados originários de células plasmáticas de longa-vida (*Long Life Plasmatic Cells* - LLPCs) e por anticorpos rapidamente produzidos a partir de células plasmáticas (*Plasmatic cells* – PCs), também conhecidas como células secretoras de anticorpos

(*Antibody Secreting Cells* - ASCs), derivadas de células B de memória (*Memory B Cells* - MBCs) (AHMED e GRAY, 1996) ou através da combinação dos dois mecanismos (CROTTY et al., 2004; LANZAVECCHIA et al., 2006; WRAMMERT et al., 2008). Em qualquer infecção, o processo de geração das células MBCs e LLPCs aos antígenos proteicos inicia-se quando células B naives encontram um antígeno cognato próximo à interface das áreas de células B e T do órgão linfóide secundário. Caso este encontro não ocorra, células B naives sofrerão apoptose dentro de meses (SPRENT, 1993).

Vários estudos sugerem que a ligação de alta afinidade com o antígeno conduz células B ativadas a proliferarem e se diferenciarem em células plasmáticas de vida-curta (*Short Life Plasmatic Cells* - SLPCs), com alguma troca de isótipo de cadeia pesada, na região extrafolicular. Estas SLPCs contribuem para o controle inicial da infecção, através da secreção de anticorpos de baixa afinidade durante semanas, morrendo em seguida por apoptose (SMITH et al., 1996). Por outro lado, a ligação de baixa afinidade ao antígeno induz células B naives em proliferação nos folículos linfóides a adentrarem nos centros germinativos (CG) primários. Após um período de 7 a 10 dias, por meio do auxílio de células T helper foliculares (T_{FH}), o processo de maturação de afinidade e troca de isotipos ocorre em maior intensidade, selecionados pela afinidade ao antígeno cognato. Sendo assim, a passagem pelo CG permite a geração de células de maior afinidade que secretarão anticorpos de maior afinidade que as SLPCs geradas inicialmente em focos extrafoliculares (WEISS et al., 2011; ZOTOS e TARLINGTON, 2012). Posteriormente à saída de tais células do CG, LLPCs migram para a medula óssea, onde residem e secretam constitutivamente anticorpos protetores, atuando como primeira linha de defesa contra reinfecções. Já as MBCs podem recircular no sangue periférico, apresentando maior capacidade de responderem, proliferarem e se diferenciarem rapidamente em ASCs secretoras de anticorpos de maior afinidade em desafios subsequentes, se comparadas às células B naives iniciais (LANZAVECCHIA et al., 2006; TANGYE e TARLINTON, 2009).

Uma das ferramentas mais utilizadas nos estudos referentes à memória imunológica de linfócitos B é o ensaio de imunoadsorção ligado à enzima em pontos (*enzyme-linked immunospot assay* - ELISpot) (CZERKINSKY et al., 1983). Neste ensaio funcional, o analito secretado, representado pelas imunoglobulinas (Igs) específicas e/ou totais produzidas a partir de MBCs pré-ativadas, são capturados

pelos antígenos/anti-anticorpos previamente utilizados na sensibilização das placas específicas para este tipo de experimento. Após a remoção das células, as Igs capturadas se fazem visíveis por intermédio de uma cascata de biotina-avidina-enzima-substrato, que resulta em pontos, denominados como “spots”, na membrana da microplaca. Cada *spot* representa uma célula secretora de anticorpo (ASCs) (revisto por JANETZKI et al., 2015).

A metodologia de ELISpot apresenta uma série de vantagens, tais como simplicidade, sensibilidade e boa aplicação em estudos vacinais. No entanto, resultados influenciados por possíveis limitações da metodologia podem estar presentes, ao invés de refletirem fenômenos biológicos reais. Neste sentido, Nogaro e colaboradores (2011) observaram frequências similares de MBCs específicas para os antígenos maláricos (PfAMA-1, PfMSP-1, PfMSP-2, PfMSP-3) e toxóide diftérico (DT), uma proteína de comprimento similar aos antígenos maláricos avaliados. Estes achados sugerem que a resposta imune aos antígenos plasmodiais não possua maior complexidade que a observada para outros antígenos. Outra questão seria se a pré-ativação de MBCs em ASCs ocorreria em uma proporção fixa ou mesmo se a técnica de ELISpot realmente reflete o que acontece *in vivo* quando ocorre o encontro das MBCs com seu antígeno cognato (NOGARO et al., 2011). Futuramente, a acurácia e sensibilidade desta técnica em estudos direcionado à malária poderá ser confirmada através de comparação direta entre as frequências de MBCs específicas determinadas por ELISpot e por intermédio de citometria de fluxo, utilizando, para tal, antígenos plasmodiais conjugados aos fluorocromos (NOGARO et al., 2011; WEISS et al., 2012; LUGAAJUU et al., 2015; PORTUGAL et al., 2015).

1.3.3.1 Aquisição e manutenção de MBCs *Plasmodium* específicas

MBCs específicas induzidas por vacinação ou infecções naturais ocasionadas por vírus causadores de doenças como varíola, sarampo e febre amarela persistem por período superior a 50 anos (NANAN et al., 2001; CROTTY et al., 2003; DORFMAN et al., 2005; AMANNA et al., 2007; WEISS et al., 2010; WIPASA et al., 2010; NOGARO et al., 2011). Por outro lado, durante infecções maláricas, estudos sugerem que MBCs específicas são induzidas de maneira ineficiente já que sua frequência é relativamente baixa (cerca de 30-50%), mesmo em adultos com múltiplas exposições ao longo da vida (DORFMAN et al., 2005; WEISS et al., 2010;

WIPASA et al., 2010; NDUNGU et al., 2012; NOGARO et al., 2011; PORTUGAL et al., 2015).

Dentre os fatores utilizados para explicar essa observação, estão a alta variação genética e antigênica dos plasmódios (SCHERF, LOPEZ-RUBIO e RIVIERE, 2008; TAKALA e PLOWE, 2009), o que sobrecarrega a capacidade do sistema imune em montar uma resposta eficaz (NOGARO et al., 2011) e a capacidade dos parasitos de modular a resposta imune do hospedeiro (COBAN et al., 2007; RILEY e STEWART, 2013; STANISIC et al., 2013; BOYLE et al., 2016). Neste sentido, são observadas interferências na responsividade de APC, células T e B, bem como profundas mudanças na composição do compartimento de linfócitos B no sangue periférico de indivíduos expostos e infectados (ASITO et al., 2008; WEISS et al., 2009; WEISS et al., 2010; ASITO et al., 2011; NOGARO et al., 2011; WEISS et al., 2011; CLARK et al., 2012; PORTUGAL et al., 2012; AYIEKO et al., 2013; ILLINGWORTH et al., 2013; MUELLENBECK et al., 2013; NDUNGU et al., 2013; AMPOMAH et al., 2014; REQUENA et al., 2014; SCHOLZEN et al., 2014; BORHIS e RICHARD, 2015; PORTUGAL et al., 2015; SUBRAMANIAM et al., 2015; SULLIVAN et al., 2016). Os parasitos podem induzir a apoptose de células do sistema imune (HELMBY et al., 2000; LUDER et al., 2001), comprometer a maturação de células dendríticas (URBAN et al., 1999), interferir na síntese de citocinas produzidas por APCs (tais com o BAFF) (LIU et al., 2012), dentre outros. No entanto, permanecem desconhecidos os mecanismos que governam as alterações no compartimento de células B na periferia (SCHOLZEN et al., 2014). Ainda que haja consenso por parte dos pesquisadores de que múltiplas exposições aos plasmódios podem induzir imunidade antimalárica, os aspectos que envolvem a geração e manutenção de MBCs *Plasmodium* específicas ainda permanecem bastante controversos (revisto por STRUIK e RILEY, 2004).

No que diz respeito à influência da endemicidade na geração/manutenção de MBCs específicas aos plasmódios, considerando que a imunidade antimalárica é alcançada mais rapidamente em áreas de alta transmissão, poderíamos supor que a prevalência e frequência de MBCs *Plasmodium* específicas sejam maiores entre indivíduos residentes nestas áreas, se comparados àqueles oriundos de áreas de transmissão esporádica. Contudo, vários estudos contestam essa afirmação (WEISS et al., 2010; WIPASA et al., 2010; NOGARO et al., 2011; CLARK et al., 2012), o que indica que a exposição crônica/persistente à infecção influencie negativamente a

geração de MBCs (revisto por PORTUGAL et al., 2013). Um exemplo disso são os recentes ensaios clínicos que demonstraram que CpG, quando administrado em associação aos candidatos vacinais AMA-1 e MSP-1₄₂ em adultos dos Estados Unidos não previamente expostos à malária, estimularam elevadas respostas de IgG e MBCs específicas (CROMPTON et al., 2009), enquanto o mesmo não foi observado em adultos cronicamente expostos a *P. falciparum* em Mali (TRAORE et al., 2009).

Outra questão que merece ser mais bem explorada refere-se à estabilidade de MBCs ao longo dos anos e dos anticorpos gerados. Em região de alta endemicidade, Weiss e colaboradores (2010) demonstraram que MBCs e títulos de anticorpos específicos aumentam após o episódio de malária aguda e, após um período de 6 meses de reduzida exposição aos parasitos, estes níveis se contraem a um ponto ligeiramente maior que os níveis exibidos na pré-infecção (WEISS et al., 2010). Por outro lado, Wipasa e colaboradores (2010) observaram níveis estáveis de anticorpos e MBCs específicos para *P. falciparum* e *P. vivax* em um seguimento de 12 meses em indivíduos com história de exposição prévia à malária, porém sem história de infecção malárica há pelo menos 6 anos, residentes em áreas de extremamente baixa transmissão na Tailândia (WIPASA et al., 2010). Do mesmo modo, Clark e colaboradores (2012), utilizando candidatos vacinais de *P. falciparum* AMA-1, CSP, EBA-175 e MSP-1₁₉, avaliaram a manutenção de memória imunológica em crianças e adultos na Amazônia Peruana (Iquitos, Peru), região caracterizada por baixa transmissão de malária. Observou-se que, mesmo entre indivíduos que relataram apenas uma infecção prévia, houve respostas de anticorpos anti-MSP-1₁₉ que foram estáveis por até 5 meses na ausência de reinfeção. Além disso, MBCs, que foram avaliadas por até 56 dias pós-infecção mostraram níveis estáveis nesse período (CLARK et al., 2012). É importante destacar que estes dois últimos trabalhos conduzidos em regiões de baixa transmissão de malária se apresentaram contrários à teoria de apoptose de MBCs e meia vida curta de anticorpos até então bastante aceita (WYKES et al., 2005; KINYANJUI et al., 2007; AKPOGHENETA et al., 2008).

Não foram observados na literatura, estudos para detecção de MBCs *Plasmodium* específicas, assim como, a determinação de flutuações no perfil fenotípico de populações e subpopulações de linfócitos B, em amostras celulares provenientes da população brasileira residente em área endêmica de malária. Além

disso, estudos realizados em outras áreas endêmicas mundiais foram realizados, predominantemente, em infecções atribuídas a *P. falciparum*. Portanto, o conhecimento deste perfil de memória faz-se de extrema necessidade, tendo em vista o elevado número de episódios de malária ocorridos anualmente no país e o impacto da doença em termos de morbidade. O conhecimento/entendimento destes aspectos focados em linfócitos B pode fornecer pistas a respeito dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e manutenção da imunidade humoral malária-específica em região endêmica brasileira e nos fornecer subsídios que auxiliem no desenvolvimento de uma vacina.

1.3.4 A modulação do perfil fenotípico de células B

Diversos estudos demonstraram a relação entre exposição/infecção malárica e flutuações no perfil fenotípico de subpopulações de células B no sangue periférico (ASITO et al., 2008; WEISS et al., 2009; WEISS et al., 2010; ASITO et al., 2011; NOGARO et al., 2011; WEISS et al., 2011; CLARK et al., 2012; PORTUGAL et al., 2012; AYIEKO et al., 2013; ILLINGWORTH et al., 2013; MUELLENBECK et al., 2013; NDUNGU et al., 2013; AMPOMAH et al., 2014; REQUENA et al., 2014; SCHOLZEN et al., 2014; BORHIS e RICHARD, 2015; PORTUGAL et al., 2015; SUBRAMANIAM et al., 2015; SULLIVAN et al., 2016). Estas flutuações também são observadas em outras condições clínicas como no lúpus sistêmico eritematoso (SLE), vírus da hepatite C (HCV) e em infecções ocasionadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CHARLES et al., 2008; SANZ et al., 2008; MOIR e FALCI, 2013).

Para caracterização imunofenotípica de células no sangue periférico, é amplamente utilizada a técnica de citometria de fluxo. Esta metodologia tornou-se muito difundida a partir da década de 90, sendo utilizada na avaliação de alterações linfocitárias, neoplasias hematopoiéticas, quantificação de moléculas solúveis tais como citocinas, dentre outras aplicações (BROWN e WITTWER, 2000). Tendo em vista que os linfócitos B expressam distintas Igs e proteínas de membrana, as quais podem atuar como marcadores fenotípicos (*cluster of differentiation* - CDs) durante seus diversos estágios de desenvolvimento (CATELAN et al., 2008), a combinação destes marcadores tem permitido a identificação de populações e subpopulações celulares específicas (**ANEXO A**).

Em meados dos anos 90, Pascual e colaboradores (1994) introduziram o sistema de classificação Bm1 - Bm5 para identificação de distintas subpopulações de células B CD19⁺ em órgãos linfoides periféricos (PASCUAL et al., 1994). Este sistema se valeu principalmente do marcador CD38 e da imunoglobulina D (IgD) para classificação de estágios de desenvolvimento de células B, desde naives à MBCs. Contudo, esta metodologia mostrou-se incapaz de permitir a distinção entre células B naives e MBCs que não trocaram de isótipo dentro da subpopulação CD38-IgD⁺ (BOHNHORST et al., 2001) restringindo, assim, a diferenciação das subpopulações de linfócitos B. Anos depois foi realizada a identificação da molécula de superfície CD27, reconhecida como um importante marcador de células B de memória em humanos. Sua expressão correlaciona tradicionalmente com a maturação da afinidade e aumento da diversidade de imunoglobulinas de superfície provenientes do processo de hipermutação somática (que é uma reação característica da passagem das células pelo CG) (AGEMATSU et al., 1997; KLEIN et al., 1998). Após esta descoberta, os subtipos de células B passaram a ser subdivididos com base na expressão de IgD e CD27 (AGEMATSU et al., 1997; KLEIN et al., 1998; SHI et al., 2003; SANZ et al., 2008). Recentemente, porém, células B do sangue periférico vêm sendo classificadas com base na expressão de CD27 e CD21 (MOIR et al., 2008). Este sistema, diferentemente dos anteriores, é capaz de diferenciar entre células B CD20⁺, as populações de B naives (CD27⁻CD21⁺), MBCs clássicas (CD27⁺CD21⁺), MBCs ativadas (CD27⁺CD21⁻) e MBCs atípicas (CD27⁻CD21⁻). A adição de anti-CD10 neste painel fenotípico permite a identificação de células B imaturas (SIMS et al., 2005; revisto por SCHOLZEN e SAUERWEIN, 2013; revisto por HVIID, BARFOD e FOWKES, 2015). Células B foliculares são geradas na medula óssea, migrando em seguida para periferia no estado imaturo/transicional, onde completam o seu desenvolvimento (ANOLIK et al., 2009). É observada a expansão das células imaturas representadas pelo fenótipo CD19⁺CD10⁺ em crianças com infecção aguda por *P. falciparum* e em modelo de infecção malárica humana controlada (*Controlled Human Malaria Infection - CHMI*) (ASITO et al., 2008; ASITO et al., 2011; NDUATI et al., 2011; SCHOLZEN et al., 2014). Algumas hipóteses tentam explicar esta expansão: é possível que a infecção malárica induza esta subpopulação a migrar da medula óssea rumo à periferia em seus estágios iniciais de diferenciação (BOHNHORST et al., 2001; SHAFFER et al., 2002), como uma reação fisiológica induzida pela linfopenia (HVIID e KEMP, 2000;

MALASPINA et al., 2007) ou em consequência do aumento do fator de ativação das células B (*B cell activating factor* – BAFF), que é uma citocina envolvida na proliferação, diferenciação e sobrevivência das células B (ROWLAND et al., 2010; LANDOLT-MARTICORENA et al., 2011; NDUATI et al., 2011; revisto por SCHOLZEN e SAUERWEIN, 2013, SCHOLZEN et al., 2014).

Células B naives, representadas pelo fenótipo $CD19^+CD10^-CD21^+CD27^-$, se comparadas às imaturas, sobrevivem mais tempo em cultura e se dividem mais rapidamente após a ligação do antígeno cognato ao receptor de células B (*B-cell receptor* - BCR) (WIRTHS e LANZAVECCHIA, 2005). O engajamento do antígeno ao BCR associado à co-estimulação via CD19/CD21 pode estimular sua ativação e diferenciação (HARWOOD e BATISTA, 2010; KUROSAKI, 2011), ocasionando aumento de expressão das moléculas de superfície CD40, CD80, CD86 e CD69. Células B naives ativadas com auxílio de linfócitos $TCD4^+$ no órgão linfóide secundário podem migrar para o centro germinativo (CG), originando, desta maneira, MBCs e LLPC (LANZAVECCHIA et al., 2006; TANGYE e TARLINTON, 2009).

Células B humanas do CG, B naives ativadas *in vitro* e as que já encontraram o antígeno, expressam em sua superfície o CD27. Como as PCs secretoras de anticorpos, representadas pelo fenótipo $CD19^+CD10^-CD21^-CD27^+CD20^-$, normalmente encontram-se em baixa frequência na circulação periférica de indivíduos saudáveis e não desafiados e visto que células do CG estão confinadas aos tecidos linfóides, a maior parte de células B $CD27^+$ do sangue periférico são tradicionalmente consideradas MBCs (revisto por KAMINSKI et al., 2012).

MBCs atípicas, definidas pelo fenótipo $CD19^+CD10^-CD21^-CD27^-$, foram primeiramente descritas como sendo residentes em tecidos linfóides e caracterizadas pela expressão do receptor inibitório denominado *Fc receptor-like protein 4* - FcRL4 (EHRHARDT et al., 2005). Em seguida, Moir e colaboradores (2008) demonstraram que estas células eram hiporresponsivas aos estímulos antigênicos usados com sucesso para induzir respostas de MBCs clássicas, além de sugerir que estas MBCs “exaustas” contribuísem para a deficiência humoral observada em indivíduos infectados pelo HIV (MOIR et al.; 2008). Relativo à malária, Weiss e colaboradores (2009) observaram que este subtipo de MBCs encontrava-se aumentado no sangue periférico de crianças e adultos expostos à infecção ocasionada por *P. falciparum*. Além disso, foi observada a influência da

endemicidade de malária na prevalência de tais células, onde indivíduos pertencentes às áreas de alta transmissão (Mali) apresentaram frequências elevadas de atípicas se comparados a de voluntários provenientes de áreas livres de malária (Estados Unidos) e experimentalmente infectados (WEISS et al., 2009).

A relação entre exposição aos plasmódios e proporções de MBCs atípicas foi em seguida confirmada em outros estudos (WEISS et al., 2010; 2011; NOGARO et al., 2011; CLARK et al., 2012; AYIEKO et al., 2013; ILLINGWORTH et al., 2013; NDUNGU et al., 2013; MUELLENBECK et al., 2013; AMPOMAH et al., 2014; REQUENA et al., 2014; SCHOLZEN et al., 2014; PORTUGAL et al., 2015; SUBRAMANIAM et al., 2015; SULLIVAN et al., 2016), porém pouco se sabe a respeito da geração, especificidade antigênica deste tipo celular e de seu envolvimento no processo de aquisição e manutenção da imunidade antimalárica. Assim, no contexto da infecção plasmodial, estas células receberam a denominação “atípicas” ao invés de “exaustas” (WEISS et al., 2009).

No que diz respeito à capacidade funcional de MBCs atípicas, Weiss e colaboradores (2009) propuseram ainda que a elevada prevalência destas células em indivíduos expostos a *P. falciparum* seria indicativo de uma resposta de MBCs disfuncional na malária. Por outro lado, Muellenbeck e colaboradores (2013) sugeriram que as MBCs atípicas são capazes de produzir anticorpos neutralizantes contra antígenos do estágio eritrocítico e, diferente das MBCs clássicas, exibem sinais de secreção ativa de anticorpos (MOIR et al., 2008; WEISS et al., 2009; PORTUGAL et al., 2013), ao invés de agirem como uma população de memória disfuncional (revisto por KUROSAKI et al., 2015). Há também estudos apontando polireatividade destes tipos celulares se comparadas às MBCs clássicas (MUELLENBECK et al., 2013), o que sugere seu papel protetor na malária independente de especificidade antigênica (DANIEL-RIBEIRO e ZANINI, 2000; FESEL et al., 2005; ZANINI et al., 2009; MANNOOR et al., 2013).

Estudos mais recentes direcionados às MBCs atípicas e clássicas no contexto da imunidade antimalárica relataram que o índice de hipermutação somática de MBCs atípicas e clássicas é indistinguível, o que indica que estas subpopulações de células B possuam história de desenvolvimento comum (PORTUGAL et al., 2015). MBCs atípicas expressam diversos receptores associados à redução da sinalização via BCR (particularmente FcRL5), o que indica que sua função efetora representada por proliferação, produção de citocinas e

secreção de anticorpos encontra-se comprometida, se comparadas às MBCs clássicas (HAGA et al., 2007; PORTUGAL et al., 2015, SULLIVAN et al., 2015).

Diante dos resultados contraditórios observados na literatura, estudos posteriores se fazem necessários a fim de se melhor elucidar qual o papel específico de MBCs atípicas na indução e manutenção da memória humoral (revisto por KUROSAKI et al., 2015). Além disso, deve-se enfatizar que, no Brasil, nenhum estudo tem investigado o perfil fenotípico dessas células em pacientes expostos ou com malária aguda.

2 JUSTIFICATIVA

Por ser a principal característica da imunidade adaptativa, a memória imunológica antígeno-específica é a base para o desenvolvimento de vacinas (SALLUSTO et al, 2010). No que se refere a doenças virais e bacterianas, o desenvolvimento de vacinas tem sido de fundamental relevância, permitindo o controle e/ou erradicação de muitas delas em todo o mundo. Um dos exemplos mais notáveis de sucesso de imunização contra agentes infecciosos refere-se à erradicação mundial da varíola em 1980 (WHO, 2010). Mesmo sucesso, contudo, não tem sido alcançado no desenvolvimento de vacinas direcionadas à doenças infecto-parasitárias como a malária, tuberculose e vírus da imunodeficiência humana (HIV) (revisto por VEKEMANS e BALLOU, 2008).

Em relação à malária, a maior parte dos estudos direcionados ao desenvolvimento de uma vacina tem sido focada em *P. falciparum*, o que se deve, em grande parte, ao seu potencial de letalidade. As hipóteses aventadas para explicar os frequentes insucessos obtidos até então com os protótipos vacinais testados, se apoiam, especialmente, na alta variabilidade antigênica apresentada pelos parasitos dessa espécie. Estima-se que existam cerca de 5.400 diferentes genes codificando diferentes antígenos de *P. falciparum* (SCHERF et al., 2008). Assim, especula-se que essa riqueza de proteínas, aliada às elevadas taxas de polimorfismos nelas observadas, poderia ser capaz de “sobrecarregar” a capacidade do sistema imunológico em selecionar e “comandar” por longos períodos um suficiente número de MBCs e LLPCs antígeno-específicas (WEISS et al., 2010). Isso explicaria a necessidade de exposição contínua aos parasitos para desenvolvimento de proteção natural. Além disso, é possível que as infecções maláricas possam inibir a habilidade do sistema imunológico em induzir e manter número suficiente de MBCs e LLPCs, já que isso depende, em grande parte, da afinidade de ligação dos antígenos maláricos aos receptores de células B (BCR). Evidências relativamente recentes de que dois protótipos vacinais contendo um potente ativador de células B (CpG) não induziram a expansão de MBCs e aumento nos níveis de anticorpos protetores em indivíduos expostos à malária, sugerem falhas na maturação de afinidade de linfócitos B (CROMPTON et al, 2009; TRAORE et al, 2009).

Observações contrárias foram feitas quando indivíduos não expostos à malária foram vacinados (CROMPTON et al, 2009, 2010). Portanto, muitos aspectos relacionados à indução e manutenção de células pertencentes ao compartimento B ainda permanecem bastante enigmáticos em indivíduos vivendo sob o flagelo malária.

P. vivax, por sua vez, até recentemente, despertava pouco interesse no contexto do desenvolvimento de estudos biológicos, imunológicos e vacinais (MENDIS et al., 2001; MUELLER et al., 2009; CARLTON et al., 2011). Esse cenário começou a ser alterado quando casos graves e óbitos relacionados a esse parasito começaram a surgir ao redor mundo, incluindo o Brasil. Além disso, o controle dessa espécie tem sido dificultado por uma série de fatores tais como (1) alta capacidade vetorial comparada a *P. falciparum* devido à habilidade de se desenvolver em baixas temperaturas e com duração reduzida do ciclo esporogônico no vetor, permitindo transmissão da doença em regiões temperadas, o tornando menos sensível às medidas de controle vetoriais efetivas para *P. falciparum*; (2) presença de formas dormentes no fígado, permitindo múltiplos episódios da doença (recaídas) resultante de uma única picada infectante, as quais não podem ser diagnosticadas e não são susceptíveis a qualquer antimalárico disponível, exceto primaquina; (3) baixas densidades parasitárias, as quais são de difícil detecção utilizando as ferramentas de diagnóstico tradicionais, podendo ocorrer erros no diagnóstico e atrasos no tratamento (o que favorece a transmissão), além de (4) gametócitos ocorrendo precocemente em infecções agudas, antes da infecção ser diagnosticada. Atualmente, grandes grupos de pesquisa têm centrado esforços em conhecer e entender fatores relacionados à biologia do parasito (por exemplo, surgimento e quebra de dormência de hipnozoítos), bem como aqueles relacionados ao desenvolvimento de imunidade (indução de memória imunológica), mas os estudos com *P. falciparum* ainda são realizados em supremacia em relação a *P. vivax*.

No Brasil não há indícios de que algum estudo tem sido conduzido com indivíduos expostos ou infectados com *P. vivax* com a finalidade de se aventar e/ou entender fatores possivelmente geradores e reguladores de memória imunológica. Aqui, onde *P. vivax* representa 85% dos casos de malária registrados anualmente, a maior parte das pesquisas são destinadas a inquéritos sorológicos que correlacionam níveis de anticorpos ou citocinas séricas com presença/intensidade de sintomas clínicos ou risco de infecção. Por outro lado, assumir como

homogêneos os resultados obtidos em regiões com distintos perfis epidemiológicos, onde características genéticas das populações expostas e das cepas locais de parasitos são heterogêneas, pode resultar em um grave equívoco. Além disso, sabe-se que *P. falciparum* e *P. vivax* apresentam características biológicas bastante distintas, impossibilitando que observações obtidas para uma espécie seja, a revelia, extrapolada para a outra. Assim, o objetivo deste trabalho foi conhecer, em âmbito fenotípico e funcional, características imunológicas associadas ao compartimento de células B em indivíduos apresentando episódio agudo da malária vivax, bem como em distintas fases da convalescença.

3 OBJETIVOS

Avaliar o perfil fenotípico e funcional de células B de memória (MBCs) durante a infecção malárica humana ocasionada por *P. vivax* e suas implicações no desenvolvimento de imunidade humoral malária-específica na região endêmica brasileira.

3.1 Objetivos específicos:

- Caracterizar os aspectos clínicos e hematológicos durante e após a malária vivax em indivíduos expostos na Amazônia Brasileira (**Parte 1**);
- Investigar a geração e persistência de anticorpos e células B de memória (MBCs) direcionadas aos peptídeos sintéticos de estágio sanguíneo (PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808)) em indivíduos expostos à malária em regiões de baixa endemicidade na Amazônia Brasileira (**Parte 2**);
- Averiguar a geração e persistência de anticorpos e células B de memória (MBCs) direcionadas à proteína recombinante de estágio sanguíneo (PvAMA-1_{DII}), bem como investigar o perfil fenotípico do compartimento de células B (incluindo MBCs clássicas e atípicas) em indivíduos naturalmente expostos a *P. vivax* (agudos, convalescentes e controles) e não expostos (**Parte 3**).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Metodologia geral

4.1.1 Área e população de estudo

Entre os meses de maio e agosto de 2013 e em fevereiro de 2014, amostras de sangue venoso foram coletadas de indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira, mais precisamente dos estados do Acre e Rondônia. Os municípios de coleta foram três: Nova Califórnia (RO), Acrelândia e Plácido de Castro (AC) (**Figura 6**), todos configurados como áreas de baixa endemicidade de malária. Em 2014, o Índice Parasitário Anual (IPA), que representa o risco de ocorrência de malária numa determinada população em uma região definida, variou nas áreas estudadas entre baixo (<10 casos/1000 habitantes) e médio (10 a 49,9 casos/1000 habitantes). Acrelândia situa-se a 30,9 quilômetros de Plácido de Castro e a 81,4 quilômetros de Nova Califórnia.

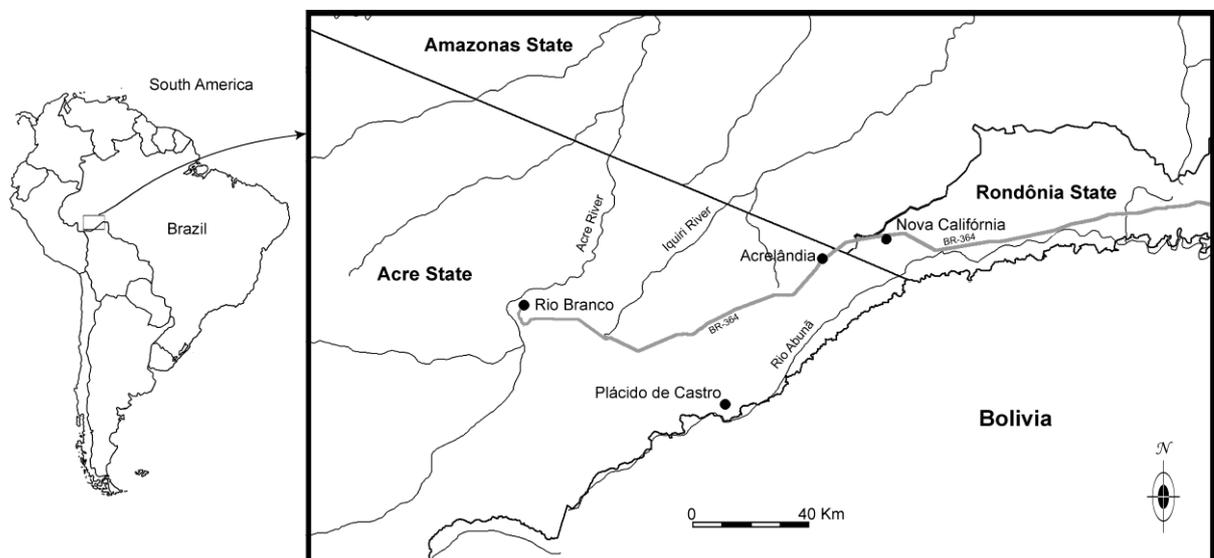


Figura 6. Locais de realização das coletas (Nova Califórnia (RO), Acrelândia e Plácido de Castro (AC)).

Para participar do estudo foram abordados indivíduos adultos em fase aguda da infecção por *P. vivax*. Essa abordagem foi realizada logo após o diagnóstico positivo da gota espessa realizado por microscopistas experientes do Sistema Único

de Saúde (SUS) e anteriormente ao início do tratamento quimioterápico preconizado pelo Ministério da Saúde (MS, 2010). Nesta ocasião, os pacientes foram informados da necessidade de coletas adicionais em outros momentos (30, 60 e 180 dias após o diagnóstico), a fim de caracterizarmos pareadamente possíveis flutuações em populações celulares, perfil de MBCs e anticorpos, bem como alterações em parâmetros hematológicos. Dos 61 indivíduos amostrados durante a fase aguda da infecção, 41, 22 e 22 foram realocados nos dias 30, 60 e/ou 180 após diagnóstico, respectivamente, e tiveram amostras de sangue coletadas. Dado o reduzido número de indivíduos realocados durante o seguimento também foram envolvidos no estudo indivíduos em fase de convalescença de malária sem necessariamente ter havido coleta na fase aguda (a confirmação das datas do último episódio agudo foram, nesses casos, baseada na data de registro do diagnóstico da doença obtida nos centros de diagnóstico de cada localidade). Além disso, indivíduos não infectados residentes na mesma área de recrutamento dos pacientes (controles expostos - CE) e provenientes de área não endêmica de malária (controles não expostos - CNE) foram convidados a participarem do estudo. A condição inicial para inclusão de todos os participantes deste estudo foi possuir idade superior a 18 anos e inferior a 60 anos. Pacientes agudos deveriam apresentar monoinfecções ocasionada por *P. vivax*. Para compor o grupo dos CE deveria ser informada ausência de infecções maláricas há, pelo menos, um ano antes da coleta da amostra biológica, independente de já terem ou não contraído malária no passado. Indivíduos CNE nunca deveriam ter visitado áreas endêmicas de malária previamente. Foi considerado critério para exclusão de todos os grupos deste estudo (agudos, convalescentes, CE e CNE) a presença de qualquer doença autoimune ou de qualquer outro tipo de imunossupressão (como HIV/AIDS, hepatite, leishmaniose e gravidez).

O processamento das amostras provenientes das áreas endêmicas de malária (pacientes e controles expostos) foi realizado no laboratório de campo da USP, chefiado pelo Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira (USP). Na época da coleta das amostras, este laboratório localizava-se dentro da Unidade Mista de Saúde de Acrelândia (UMA) (**Figura 7**). Todas as etapas de processamento do material biológico foram realizadas em no máximo seis horas após a coleta, o que foi possível tendo em vista sua proximidade com as áreas estudadas. Já amostras de controles não expostos foram obtidas de voluntários de Juiz de Fora/MG, sendo

processadas no Núcleo de Pesquisas em Parasitologia da UFJF (NUPEP). Todos os participantes deste estudo (pacientes e controles) assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**ANEXO B**) e, posteriormente, responderam a um questionário clínico-epidemiológico previamente elaborado e testado (**ANEXO C**).

Para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral blood mononuclear cell* - PBMCs) e plasma, 40mL de sangue foram coletados em tubos contendo heparina. Para realização do hemograma automatizado e obtenção de DNA, 4mL de sangue foi acondicionado em tubos do tipo “vacutainer” contendo EDTA. O hemograma automatizado (Micros 60) (Horiba, França) permitiu a determinação de seus parâmetros hematológicos como hematócrito, hemoglobina, plaquetas, leucócitos, linfócitos e monócitos. O delineamento experimental deste estudo encontra-se ilustrado no **ANEXO D**. Após a coleta de sangue, o paciente recebeu tratamento malária específico (cloroquina por 3 dias + primaquina por 7 ou 14 dias em infecções ocasionadas por *P. vivax* e arteméter + lumefantrina ou artesunato + mefloquina por 3 dias em infecções ocasionadas por *P. falciparum*) (MS, 2010). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Juiz de Fora (parecer número: 362.875 CEP) (**ANEXO E**).



Figura 7. Imagens das atividades de campo. Unidade Mista de Saúde de Acrelândia, AC (A); Moradia típica da área do estudo (Plácido de Castro, AC) (B); Coleta de sangue em paciente envolvido no estudo (C).

4.2 Metodologias destinadas ao objetivo específico 1

4.2.1 Diagnóstico laboratorial da infecção por *Plasmodium*

4.2.1.1 Diagnóstico microscópico

O diagnóstico da infecção por *P. vivax* foi primeiramente realizado por meio do exame da gota espessa, segundo preconizado pelo Ministério da Saúde (SVS-MS, 2009). Para isso, duas gotas de sangue periférico, obtido através de punção digital com auxílio de lanceta estéril, foram espalhadas em uma lâmina de microscopia de maneira a se formar dois retângulos de tamanho e espessura adequados (aproximadamente 1,2 cm²). A coloração foi feita segundo o Método de Walker. Para tal, após o sangue secar à temperatura ambiente (TA), realizou-se a desesglobinação usando-se solução hipotônica de azul de metileno por dois segundos. Então, o esfregaço sanguíneo foi cuidadosamente enxaguado utilizando água tamponada, seguindo-se coloração com solução de Giemsa (0,075% massa/volume) por 10 minutos. O esfregaço foi novamente enxaguado utilizando água tamponada e seco à TA. Todas as lâminas confeccionadas durante a realização deste estudo foram examinadas por microscopistas treinados da SESACRE em objetiva de imersão (1000X).

A determinação microscópica da parasitemia foi realizada segundo preconizado pelo Ministério da Saúde (SVS-MS, 2005). Para tal, foi feita a leitura dos campos necessários até o alcance de 200 leucócitos, com determinação simultânea do número de parasitos assexuados utilizando objetiva de imersão (1000X). Tendo em vista que uma leucometria padrão durante a malária é de 6000 leucócitos/ μ L de sangue, o valor da parasitemia/ μ L foi obtida através da seguinte fórmula: $\text{parasitemia}/\mu\text{L} = (\text{n}^\circ \text{ de parasitos assexuados} \times 6000)/200$. A contagem da parasitemia dos participantes deste estudo foi gentilmente realizada pelo microscopista Milton Ferreira de Castro, funcionário da Gerência Regional de Saúde de Juiz de Fora (GRS).

4.2.1.2 Diagnóstico molecular

O diagnóstico confirmatório da infecção malárica foi realizado no Laboratório de Malária do CPqRR/Fiocruz - MG, sob supervisão da Profa. Dra. Luzia Helena de Carvalho, através de metodologia previamente padronizada de PCR diagnóstico em

tempo real utilizando os alvos *Pvr47* e *Pfr364* pertencentes a *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente (AMARAL, 2014).

4.2.1.2.1 Extração de DNA utilizando sangue total

A extração de DNA a partir de sangue total foi realizada utilizando-se o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). Rapidamente, tubos de microcentrifuga contendo 300uL de sangue foram incubados com 900uL de uma solução de lise celular e 1,5uL de solução de Rnase A (4mg/ml) a 37°C em banho-maria por 30 minutos. A seguir, 100uL de solução de precipitação de proteína foram acrescentados a cada amostra, sendo as mesmas homogeneizadas e centrifugadas a 13.000g por 3 minutos. Após o sobrenadante ter sido transferido para tubos devidamente identificados, adicionou-se 300uL de isopropanol (Sigma Aldrich, USA). Os tubos foram invertidos cerca de 30 vezes e centrifugados por 1 minuto a 13.000g. A seguir, o sobrenadante foi novamente removido por inversão em papel absorvente acrescentando-se aos mesmos 300uL de etanol 70% (Sigma Aldrich, USA) para a lavagem do sedimento e remoção de traços de sal. As amostras foram, então, novamente centrifugados por mais 1 minuto a 13.000g. Cerca de 15 minutos após o etanol ter sido desprezado, o DNA foi ressuspenso em uma solução de rehidratação (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA, pH 8,0) e mantidos a -20 °C até o momento de uso.

4.2.1.2.2 PCR Diagnóstico em tempo real

Com intuito de se realizar o diagnóstico molecular da infecção malárica, os iniciadores para a PCR em tempo real foram desenhados por Amaral (2014) através dos programas *OLIGO* (versão 4.0, 1999) e *Primer-Blast* (NCBI) observando-se regiões não ribossomais conservadas nos alinhamentos de cada espécie. Os alinhamentos foram realizados com base nas sequências disponibilizadas por Demas et al. (2011), sendo 14 cópias da família *Pvr47* (*P. vivax*) e 41 cópias da família *Pfr364* (subfamílias 1 e 2 de *P. falciparum*).

Para o alvo *Pvr47* foi obtido o par 5'CATTGCTGGTGCTTGTACTTA3' (*foward*) e 5'ATGATTTGCTGGAGATGTTAAA3' (*reverse*), que se liga respectivamente às posições 255-275 e 340-361 do genoma do parasito, resultando em um amplificado de 107 pb. Já para o alvo *Pfr364* foi obtido o par 5'ACTAATTTTCCCCTTGCACTTT3' (*foward*) e 5'TGCAAAGTTATAGTAATTAGAT3' (*reverse*), que se liga às posições

19-40 e 70-91 do genoma, respectivamente, resultando em um amplificado de 73 pb (AMARAL, 2014). Os pares de iniciadores e as condições estabelecidas nas reações padronizadas são especificados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Iniciadores e condições de reação

Espécie alvo	Iniciador	Sequência	Tm*
<i>P. vivax</i>	PvDig F	5'CATTGCTGGTGCTTGACTTA3'	72.7 a 74.1°C
	PvDig R	5'ATGATTTGCTGGAGATGTTAAA3'	
<i>P. falciparum</i>	PfDig F	5'ACTAATTTTCCCCTTGCACTTT3'	75.6 a 77.7°C
	PfDig R	5'TGCAAAGTTATAGTAATTAGAT3'	

*Tm= Temperatura de dissociação.

A reação da PCR diagnóstico foi padronizada para os alvos de *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo as condições dos reagentes estabelecidas de forma diferente para cada par de iniciador (AMARAL, 2014). Para amplificação da sequência de *P. vivax*, foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 0,25µM de cada iniciador (IDT) (Invitrogen), 5µl de SYBR® Green PCR Master Mix (SYBR Green 2x, AmpliTaq Gold® DNA polimerase, dNTP com dUTP, referência passiva (ROX) e componentes do tampão otimizados) (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), acrescido de 2,5mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 2µl de DNA, em um total de 20µl por reação. Já para amplificação da sequência de *P. falciparum*, foram estabelecidas as seguintes concentrações de reagentes: 1µM de cada iniciador (IDT), 5µl de SYBR® Green PCR Master Mix, acrescido de 2,5mM de MgCl₂ e 2µl de DNA, em um total de 20µl por reação.

As condições da PCR consistiram em uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por amplificação com 40 ciclos de 90°C por 20 segundos, 58°C por 30 segundos e 60°C por 30 segundos, com aquisição de fluorescência ao final de cada passo de extensão. A amplificação foi imediatamente seguida por um programa de dissociação, consistindo em 95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos e 95°C por 15 segundos. As curvas de dissociação (*melting*) apresentaram temperatura de dissociação (Tm) variando entre 72,7°C e 74,1°C para *P. vivax* e entre 75,6°C e 77,7°C para *P. falciparum*, sendo estas observadas através da avaliação de fluorescência contínua (F) a 530nm enquanto a temperatura aumentava gradualmente de 60 para 95°C. Os gráficos de dissociação foram

visualizados plotando a derivada negativa de fluorescência pela temperatura ($-dF/dT^\circ$ vs. T°) (**Figura 8**).

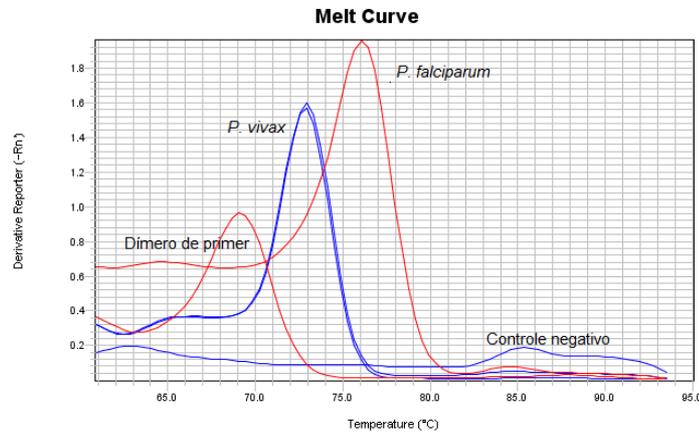


Figura 8. Curvas de dissociação do PCR Real-Time. *P. falciparum* (vermelho) e *P. vivax* (azul), juntamente com o controle negativo. As curvas de melting foram observadas por avaliação da derivada negativa de fluorescência pela temperatura ($-dF/dT^\circ$ vs. T°). Legenda: *Melt curve*: curva de dissociação.

As reações da PCR foram realizadas na presença de controles positivos e negativos e as amostras foram feitas em duplicata. Como controles negativos foram utilizados todos os reagentes na ausência de DNA, sendo este substituído por água deionizada para PCR (Sigma Aldrich). Como controles positivos foram utilizados DNA de *P. falciparum* proveniente de cepa referência de cultivo contínuo estabelecido no Laboratório de Malária do CPqRR e DNA de indivíduos sabidamente infectados por *P. vivax* com parasitemias confirmadas pela microscopia óptica e outros protocolos de PCR. Amostras com resultado duvidoso foram submetidas a uma segunda reação.

4.3 Metodologias comuns aos objetivos específicos 2 e 3

4.3.1 Obtenção de PBMCs

Para obtenção de PBMCs, amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo heparina. Após a coleta, o sangue foi diluído em igual volume em solução de Hanks 1X (Sigma Aldrich, USA) e então dispensado cuidadosamente sobre o Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Reino Unido) na proporção 2:1 (sangue/Ficoll). Seguiu-se a centrifugação a 500g por 17 minutos a fim de se obter a separação dos

PBMCs por gradiente de densidade. Posteriormente, o anel de células mononucleares foi coletado e submetido a duas lavagens sequenciais com solução de Hanks 1x, centrifugando-se a 300g por 10 minutos. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Cultilab, Brasil) e 1% de uma solução contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B (Sigma Aldrich, USA). Então, as células foram contadas em câmara de Neubauer (diluição 1:20) e, após terem sua viabilidade determinada utilizando-se de azul de trypan 0,04% (Sigma Aldrich, USA), a concentração celular foi ajustada para 10^7 células/mL. O congelamento foi realizado utilizando-se solução contendo SFB 90% (Cultilab, Brasil) e DMSO (Dimetilsulfóxido) 10% (Sigma Aldrich, USA). As células foram mantidas *overnight* em ultrafreezer -80°C em recipiente Mr.Frosty™ (Nalgene, USA) e, em seguida, acondicionadas em nitrogênio líquido (-196°C).

Para o procedimento de caracterização fenotípica e ELISpot, cada criotubo contendo as PBMCs foi retirado do container de nitrogênio líquido e descongelado rapidamente em banho-maria (37°C). A suspensão celular foi transferida para um tubo cônico de 15 cm contendo 10mL de meio RPMI completo - RPMI-1640 (Gibco, Reino Unido) suplementado com 20% de SFB inativado (Cultilab) e solução contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B (1%) (Sigma Aldrich, USA). Em seguida, o tubo foi centrifugado a 500g a 4°C por 10 minutos. O sobredanadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em um mL de meio completo. A viabilidade celular foi avaliada em câmara de Neubauer (diluições 1:10 e 1:100), utilizando-se azul de tripan 0,04% (Sigma Aldrich, USA) e, em seguida, a concentração celular foi ajustada de acordo com as necessidades de cada experimento.

4.3.2 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e funcionais (ELISpot)

4.3.2.1 Antígenos

Antígenos elaborados a partir da análise de duas importantes proteínas presentes no estágio sanguíneo de *P. vivax* (AMA-1 e MSP-9) foram empregados nos ensaios de ELISA e ELISpot (WALTHER et al., 2005). Devido às dificuldades de obtenção de extratos proteicos de *P. vivax*, estudos envolvendo essa espécie normalmente são conduzidos utilizando peptídeos sintéticos ou proteínas recombinantes. Bueno e colaboradores (2011), através do uso de ferramentas de

bioinformática observaram que, o epítopo que alcançou simultaneamente os melhores escores de predição para compor um peptídeo linear de células B correspondem aos resíduos 290-307 de PvAMA-1 (SASDQPTQYEEEMTDYQK) (PvAMA-1_(S290-K307)). Este peptídeo foi selecionado e produzido em colaboração com o laboratório Biofísica chefiado pelo Dr. Clóvis R. Nakaie (UNIFESP). No mesmo sentido, foram utilizados os resíduos 795-808 (EAAPENAEPVHENA) (PvMSP-9_(E795-A808)) para elaboração do peptídeo linear de PvMSP-9. Este peptídeo foi predito e gentilmente cedido pelo Dr. Josué da C. Lima-Júnior (Fiocruz-RJ) para execução dos experimentos propostos. A proteína recombinante representada pelos aminoácidos 249 a 385 de PvAMA-1 (Domínio II) foi expressa e purificada como previamente descrito (RODRIGUES et al., 2005; MÚFALO et al., 2008) e foi gentilmente cedida pela Dr^a. Irene da S. Soares da Universidade de São Paulo (USP).

4.3.2.2 Determinação do perfil de IgGs totais *Plasmodium*-específicas por ELISA

A determinação dos níveis plasmáticos dos anticorpos IgG direcionados aos antígenos de *Plasmodium* descritos no item **4.3.2.1** foi realizada em duplicata. Para isso, microplacas de ELISA (Costar, Cambridge, MA) foram sensibilizadas a 4 °C por 18 hs utilizando, para tal, concentrações previamente definidas dos antígenos (5 µg/mL para os peptídeos sintéticos PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808) e 2 µg/mL para proteína recombinante PvAMA-1_{DII}), diluídos em PBS (pH = 7,2) (100µL/poço). Após a sensibilização, as placas foram lavadas três vezes com PBS, e, em seguida, foram bloqueadas com solução de leite desnatado (Molico, Nestlé) a 5% em PBS-Tween (PBS/T) (200µL/poço) por 2 horas a 37°C. Posteriormente, 100 µL das amostras de soros diluídas a 1/100 em solução de Molico a 2,5%-PBS/T, foram adicionados aos poços. Após o tempo de incubação de 1 hora a 37°C, as placas foram novamente submetidas a três lavagens com PBS/T e o conjugado anti-IgG humano ligado a peroxidase (Sigma, St. Louis, MO), diluído 1/5000 em solução de Molico a 2,5%-PBS/T (100µL/poço) foi adicionado, seguindo novamente incubação a 37°C por 1 hora. Transcorrido este tempo, as placas foram lavadas por três vezes com PBS/T e a reação enzimática revelada pela adição de OPD (*O-Phenylenediamine Dihydrochloride*) (Sigma, St. Louis, MO), diluído em tampão fosfato-citrato (pH = 5,0) contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (100 µL/poço). As placas foram então incubadas a TA e protegidas da luz até a reação ser interrompida pela adição de 50 µL/poço de uma solução de H₂SO₄ 2N. Os valores

das absorvâncias (DO) foram medidos a 492nm com o uso do leitor de ELISA (Spectramax 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). O limite de positividade do teste (*cut off*) foi definido pela média das absorvâncias das amostras de indivíduos não expostos à malária acrescido de três desvios-padrão. Os valores de *cut off* foram calculados em cada ensaio, que incluía pelo menos cinco diferentes controles negativos em cada placa testada, além de dois soros positivos para o controle interno do teste. Os resultados obtidos foram expressos em índice de reatividade (IR), dividindo-se a absorvância média obtida para cada amostra avaliada pelo valor de *cut-off* determinado para cada antígeno testado. Amostras com $IR \geq 1$ foram consideradas positivas. Este experimento foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia, IOC/Fiocruz – RJ.

4.3.2.3 Ensaio de ELISpot para avaliação da resposta de MBCs

Neste ensaio foi determinada a capacidade de células B provenientes de indivíduos na fase aguda e convalescença de malária responder, *in vitro*, aos estímulos antigênicos, configurando memória imunológica. Para execução deste ensaio foi utilizado o kit *ELISpot PLUS for Human IgG* (Código do produto: 3850-2AW-Plus) (Mabtech, Sweden), segundo versão modificada da metodologia desenvolvida por Crotty e colaboradores (2003) (JAHNMATZ et al., 2013). Inicialmente, PBMCs foram descongeladas e cultivadas na concentração de 2.5×10^6 células/mL em placas de cultura de 24 poços (Corning, USA) em meio RPMI-1640 suplementado com 25mM de bicarbonato de sódio, 25mM de HEPES (Sigma Aldrich, USA), 3 mM de L- glutamina (Sigma, St. Louis, MO), 3% de uma mistura de antibióticos (100 U/mL de penicilina e 10 μ g/mL de estreptomicina) (Sigma Aldrich, USA) e 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab, Brasil), contendo um coquetel de ativadores policlonais de células B (R848 a 1 μ g/mL e IL-2 a 10 ng/mL), procedendo a incubação a 37 °C, 5% CO₂ por três dias.

A seguir, placas de ELISpot de 96 poços (PVDF, Tipo MAIPSWU) (Millipore) tiveram suas membranas pré-ativadas pela adição de 50 μ L de etanol 70% (Sigma Aldrich, USA). Após lavagem com 200 μ L/poço de água estéril por 5x, as placas foram sensibilizadas com 100 μ L/poço com 15 μ g/mL de uma solução de anticorpo de captura MT91/145 para detecção de ASCs secretoras de IgGs totais, antígenos plasmodiais para detecção de ASCs secretoras de IgGs específicas (10 μ g/mL para

os peptídeos sintéticos PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808) e 5 µg/mL para proteína recombinante PvAMA-1_{DII}) e meio RPMI contendo soro fetal bovino (SFB) a 10% para detecção de respostas inespecíficas. Após incubação *overnight* a 4-8 °C, a placa foi lavada 5x utilizando 200 µL/poço de PBS estéril. As placas foram, então, bloqueadas utilizando-se 200 µL/poço de meio RPMI contendo SFB 10% por 30 minutos a TA. Para detecção das ASCs, as células cultivadas foram lavadas e plaqueadas em duplicata utilizando, para tal, 5 x 10⁵ células/poço para respostas *Plasmodium*-específicas ou 5 x 10⁴ células/poço para detecção de células secretoras de IgG totais. As placas foram incubadas a 37 °C, 5% CO₂ por 24 horas.

Para revelação, as placas foram lavadas 5x com 200 µL/poço de PBS 1x. Para detecção de células secretoras de IgG total e específicas, 100 µL de PBS-0,5% SFB contendo o anticorpo de detecção biotilado MT78/145 a 1µg/mL foi adicionado a cada poço. A placa foi, então, incubada por 2 horas em TA e, a seguir, lavadas 5x com 200 µL/poço PBS 1x. Posteriormente, foram adicionados a cada poço 100 µL de solução de estreptavidina-ALP (1:1000) diluído em PBS-0,5% SFB sendo, as placas, incubadas por 1 hora a TA. A seguir, as mesmas foram lavadas 5x com 200 µL/poço de PBS 1x. A revelação dos pontos relativos à secreção de anticorpos foi realizada utilizando-se 100 µL/poço de solução do substrato BCIP/NBT-*plus*. Após aparecimento dos pontos, a reação foi interrompida através de lavagem sob água corrente, permitindo a secagem das placas em TA. A leitura do experimento foi realizada com auxílio do leitor automatizado ImmunoSpot S5 UV ultra analyser (CTL, USA). Cada ponto foi definido como uma única célula produtora de anticorpo. MBCs antígeno específicas foram expressas como número de ASCs antígeno-específicas por 10⁶ PBMCs e como percentual (%) de ASCs antígeno-específicas (número de ASCs antígeno-específicas por 10⁶ PBMCs/ número de ASCs secretoras de IgGs totais x 100). Amostras que apresentaram percentuais de viabilidade inferior a 90% no momento do descongelamento foram excluídas do ensaio. Este experimento foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia, IOC/Fiocruz – RJ.

4.4 Metodologia destinada ao objetivo específico 3

4.4.1 Caracterização fenotípica dos subtipos de células B

A fenotipagem das subpopulações de células B circulantes no sangue periférico foi realizada conforme metodologia descrita por Illingworth e colaboradores (2013). Para tal, foram utilizados os marcadores de superfície descritos na **Tabela 2**. Células não viáveis foram identificadas como 7-AAD (Biolegend, n° de catálogo 420404) positivas e foram então excluídas das análises. Células B foram identificadas pelos seguintes fenótipos: B totais (CD19⁺), imaturas (CD19⁺CD10⁺), naives (CD19⁺CD10⁻CD21⁺CD27⁻), MBCs clássicas (CD19⁺CD10⁻CD21⁺CD27⁺), MBCs atípicas (CD19⁺CD10⁻CD21⁻CD27⁻), MBCs ativadas (CD19⁺CD10⁻CD21⁻CD27⁺CD20⁺) e PCs (CD19⁺CD10⁻CD21⁻CD27⁺CD20⁻).

Tabela 2. Lista dos anticorpos monoclonais usados na fenotipagem de células B

Anticorpo	Fluorocromo	Concentração do Fabricante	Marca	Clone	N° catálogo
CD3	PE-Cy7	0,2mg/mL	BD Pharmingen	Leu4	557851
CD19	FITC	0,2mg/mL	BioLegend	H1B19	302206
CD20	Pacific Blue	0,5mg/mL	BioLegend	2H7	302320
CD21	APC	25µg/mL	BioLegend	Bu32	354906
CD27	PE	0,1mg/mL	BioLegend	M-T271	356406
CD10	PC5.5	50µg/mL	Beckman Coulter	ALB1	PN B16490
CD10	ECD	12,5µg/mL	Beckman Coulter	ALB1	PN IM3608U

Para execução deste ensaio, os anticorpos monoclonais foram previamente titulados utilizando-se células de indivíduos não pertencentes ao grupo experimental, mas submetidos às mesmas condições de coleta, processamento e armazenamento. As concentrações de uso para os anticorpos marcados com fluorocromos são aquelas descritas na **Tabela 3**. Para a marcação fenotípica das células B circulantes em indivíduos com infecção aguda, indivíduos convalescentes, CE e CNE, as PBMCs foram descongeladas e tiveram sua viabilidade e número estimado conforme descrito no item **4.3.1**. Após a determinação do número de células viáveis, 10⁶ células (100µL) foram transferidas para microplacas de cultura contendo 96 poços (Corning, USA), seguindo-se centrifugação a 600g, por 5 min a 4°C para obtenção do sedimento de células. O sobrenadante foi então descartado e o sedimento celular ressuspensionado em 20µL/poço de uma mistura contendo os anticorpos monoclonais, previamente titulados.

Tabela 3. Títulos dos anticorpos monoclonais usados na fenotipagem de células B

Anticorpo	Fluorocromo	Diluição de uso
CD3	PE-Cy7	1/20
CD19	FITC	1/20
CD20	Pacific Blue	1/40
CD21	APC	1/25
CD27	PE	1/40
CD10	PC5.5	1/10
CD10	ECD	1/10

Em seguida, a placa foi incubada ao abrigo da luz por 20 min a 4°C. Após este período, foi adicionado 200µL de PBS e a centrifugação realizada a 600g, por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspensão em 300µL de PBS e mantido a 4°C (caso fosse adquirido no citômetro nas próximas horas) ou fixado em igual volume em solução de paraformaldeído a 1% (Sigma Aldrich, USA).

Pelo menos 10⁵ eventos (100000 células) por amostra foram adquiridos no citômetro de fluxo MoFlo Astrios (Beckman Coulter, USA), disponível na Plataforma de Citometria de Fluxo, Laboratório de Imunoparasitologia, IOC/Fiocruz – RJ. Foram utilizados para compensação de cores, células provenientes de indivíduos sadios marcadas individualmente com cada fluorocromo utilizado no protocolo citofluorimétrico (marcação simples), bem como células sem marcação. Os dados foram analisados no *software* Summit 6.2.3 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA). Buscou-se realizar simultaneamente a análise fenotípica das amostras disponíveis de cada participante (0, 30, 60 e/ou 180 dias), a fim de se evitar possíveis variações interexperimentais (SCHOLZEN et al., 2014). A estratégia de análise utilizada para definir as subpopulações de células B encontra-se ilustrada na **Figura 9**.

4.5 Análise estatística

Todas as análises estatísticas univariadas foram conduzidas utilizando o programa GraphPad Prism 5[®] (GraphPad Inc., EUA). O teste Kolmogorov-Smirnov foi inicialmente utilizado para determinar a normalidade dos dados. Para todas as análises de variáveis contínuas, foram utilizados os testes não-paramétricos. Na avaliação de dados não pareados, a diferença entre mais de dois grupos avaliados foi inicialmente avaliada pelo teste de Kruskal Wallis, seguido de comparações dois a dois com testes de Mann-Whitney. Para dados pareados, as diferenças entre mais

de dois grupos avaliados foi inicialmente avaliada pelo teste de Friedman, seguido de comparações dois a dois com testes de Wilcoxon. Proporções em amostras independentes foram comparadas por testes do Qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher. Spearman foi utilizada para correlacionar variáveis quantitativas não paramétricas. Para todos os testes foi estabelecido um nível de significância de 5%.

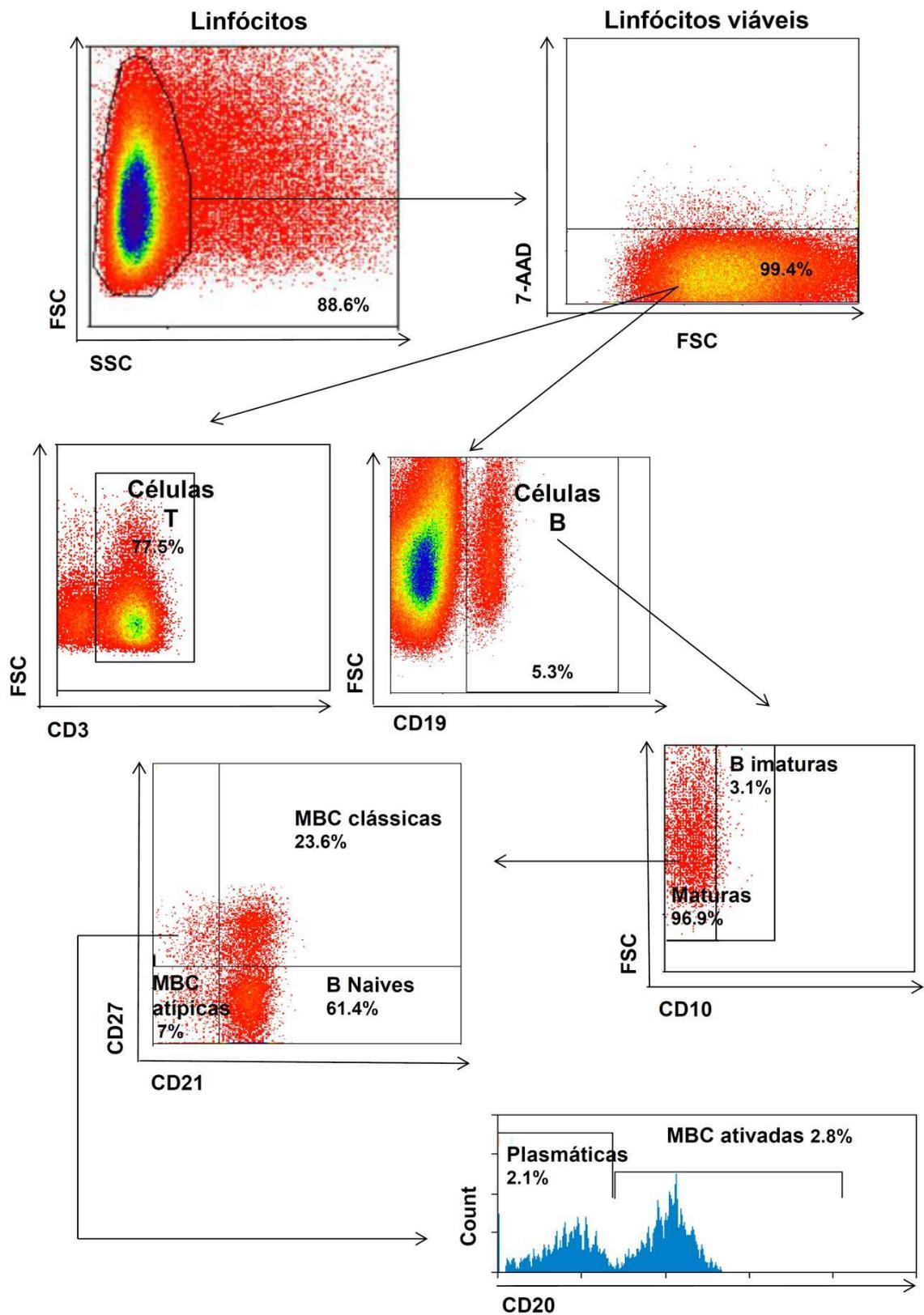


Figura 9. Estratégias utilizadas para análise fenotípica de distintos subtipos de células B via citometria de fluxo. Células B totais foram identificadas pela expressão de CD19 e, em seguida, os subtipos foram identificados pela expressão de CD10, CD20, CD21 e CD27. Os gráficos de pontos (“dot-plots”) e as frequências dos subtipos de células B em relação ao percentual exibido pelas B totais foram exibidos nos quadrantes (“gates”) e são exemplos representativos.

5 RESULTADOS

Os resultados apresentados nesta tese foram exibidos na forma de capítulos, contendo introdução, resultados e discussão referentes a cada parte abordada:

- **Parte 5.1** Aspectos clínicos e hematológicos durante e após a malária vivax em indivíduos expostos na Amazônia Brasileira;
- **Parte 5.2** Anticorpos e células B de memória circulantes de longa duração aos antígenos de fase sanguínea de *Plasmodium vivax* (AMA-1 e MSP-9) em indivíduos expostos em regiões de baixa endemicidade de malária na Amazônia Brasileira;
- **Parte 5.3** Perfil de células B de memória específicas para o Antígeno 1 de Membrana Apical de *Plasmodium vivax* (PvAMA-1) e cinética de subpopulações de células B em indivíduos da Amazônia Brasileira naturalmente expostos a *Plasmodium vivax*.

Parte 5.1 Aspectos clínicos e hematológicos durante e após a malária vivax em indivíduos expostos na Amazônia Brasileira

5.1.1 Introdução

Plasmodium vivax e *Plasmodium falciparum* são as principais espécies causadoras de malária em seres humanos, mas, até recentemente, grande parte das pesquisas e financiamentos para o combate da doença foram focados em *P. falciparum* (WHO, 2015a). Embora os óbitos por malária sejam atribuídos majoritariamente a esta espécie de plasmódio, a predominância de episódios de malária vivax em algumas das regiões do globo, tais como as Américas e a Ásia, juntamente com o aumento dos relatos de casos graves e fatais atribuídos a *P. vivax*, reafirma a importância de se reverter a negligência histórica desta infecção (MENDIS et al., 2001; CARLTON et al., 2008; MUELLER et al., 2009).

No Brasil, *P. vivax* é responsável por cerca de 84% dos casos de malária, sendo que mais de 99% destes ocorrem na região Amazônica (WHO, 2015a). Apesar do elevado número de casos clínicos registrados anualmente, o número de óbitos no país é reduzido (cerca de 26 em 2015) (BRASIL, 2016) e, quando ocorrem, referem-se a casos importados ou extra Amazônicos, estando, majoritariamente, atribuídos a uma série de complicações ocasionadas pelo diagnóstico laboratorial tardio, susceptibilidade do hospedeiro, dentre outros fatores (TAYLOR, PAROBEK e FAIRHURST, 2012). Ao contrário do observado com *P. falciparum*, a infecção por *P. vivax* foi considerada por muitos anos uma doença benigna, estando geralmente acompanhada por baixas parasitemias sanguíneas (PRICE et al., 2007; BAIRD, 2007; BAIRD, 2013). Contudo, a partir da última década, casos graves de malária vivax caracterizados por anemia grave, síndrome da angústia respiratória aguda (*acute respiratory distress syndrome* - ARDS), falência renal, plaquetopenia e icterícia têm sido relatados em muitas partes do mundo, incluindo o Brasil (ALEXANDRE et al., 2010; ANDRADE et al., 2010; LACERDA et al., 2012).

Sabe-se que alterações em parâmetros hematológicos desempenham papel fundamental na patogenia da malária, estando muitas vezes associadas à morbidade e mortalidade dos indivíduos afetados (PRICE et al., 2001; EHRHART et al., 2004). Estas alterações, associadas à presença de sintomas clínicos inespecíficos, tais como febres, dores de cabeça e calafrios, juntamente ao relato de exposição em áreas endêmicas para a doença, podem direcionar a suspeita clínica,

que deverá ser confirmada de imediato através do diagnóstico laboratorial (KOTEPUI et al., 2015).

Anemia e plaquetopenia são relatadas como principais complicações hematológicas presentes na malária (WICKRAMASINGHE et al., 2000), sendo associadas às causas multifatoriais (ABDALLA et al., 1980; PRICE et al., 2001; GENTON et al., 2008; LACERDA, 2007). Dentre estas, estão a destruição dos eritrócitos infectados e não infectados na circulação periférica e órgãos, além de distúrbios na hematopoiese (JAKEMAN et al., 1999; WICKRAMASINGHE et al., 2000). Infecções concomitantes e deficiências nutricionais contribuem para o agravamento do quadro anêmico do paciente (revisto por EKVALL, 2003). Já a plaquetopenia pode ser atribuída à ativação plaquetária (LEE et al., 1997) e/ou apoptose (PIGUET et al., 2002), ocasionando remoção acentuada de tais células pelo sistema imune do hospedeiro (ERHART et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi determinar a ocorrência de anemia, plaquetopenia e outras alterações hematológicas em indivíduos expostos à malária em áreas de baixa endemicidade. O conhecimento deste perfil poderá auxiliar na identificação de possíveis complicações induzidas por *P. vivax*, permitindo, desta maneira, o manejo adequado dos casos mais graves.

5.1.2 Resultados

5.1.2.1 Diagnóstico laboratorial

Sessenta e um indivíduos que procuraram o serviço de diagnóstico de malária disponível em Postos de Saúde das cidades de Nova Califórnia (Rondônia), Acrelândia e Plácido de Castro (ambas localizadas no estado do Acre) foram convidados a participar do estudo imediatamente após a confirmação da infecção por meio do exame de gota espessa. Nestes pacientes, somente infecções ocasionadas por *P. vivax* foram observadas microscopicamente, sendo a parasitemia média observada de 2387 parasitos/mm³ de sangue (1128 – 3646; 95% CI). Parte destes indivíduos tiveram amostras de sangue coletadas nos dias 30 (n = 41), 60 (n = 22) e/ou 180 (n = 22) decorridos da infecção, o que permitiu a avaliação de possíveis alterações em parâmetros hematológicos observados durante a fase aguda da infecção (4, 2 e 8 pacientes que foram, posteriormente, incluídos nos grupos convalescentes de 30, 60 e 180, respectivamente, não tiveram amostras

sanguíneas coletadas na fase aguda da infecção) (**Figura 10**). Para confirmar a espécie de parasito determinado pelo esfregaço sanguíneo, bem como para excluir a ocorrência de infecções mistas na fase aguda ou infecções simples/mistas nas convalescenças de 30, 60 e 180 dias, todos os participantes do estudo tiveram suas amostras de sangue também analisadas por meio da PCR em tempo real.

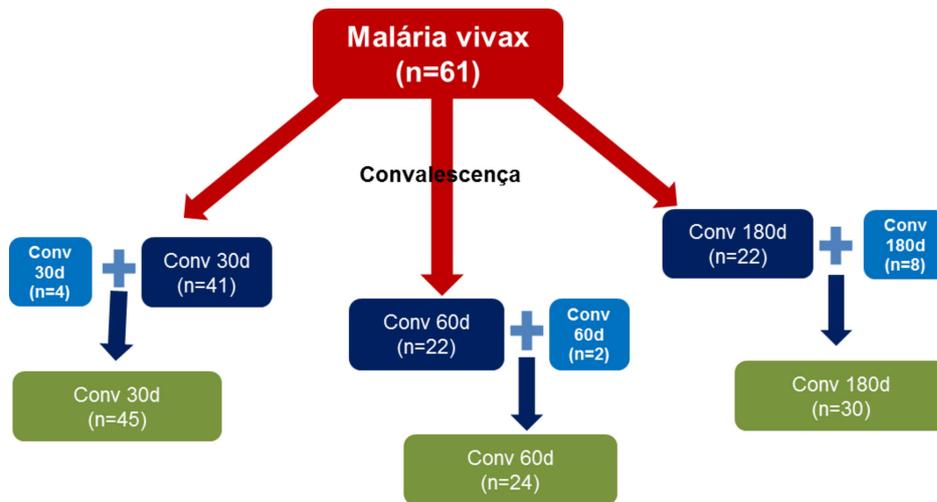


Figura 10. Fluxograma ilustrando a composição dos grupos pertencentes ao estudo

Indivíduos residindo em área endêmica ($n = 28$), porém, sem qualquer sintoma sugestivo de malária há, pelo menos, um ano, foram incluídos no estudo sendo considerados referência para os dados obtidos. Visto que indivíduos expostos à malária em área endêmica podem apresentar parasitemias na ausência de qualquer sintoma da doença, a ausência da infecção nesses indivíduos também foi confirmada por meio da PCR (SCOPEL et al., 2004; DA SILVA-NUNES et al., 2008).

Os resultados do diagnóstico molecular confirmaram que os 61 pacientes tidos como agudos no ato da coleta foram também positivos para presença de infecção malárica quando utilizou-se a PCR. Com relação aos indivíduos convalescentes de 30 dias, 8,8% ($n = 4$) apresentaram infecção subpatente na ausência de sintomas, enquanto 16,6% ($n = 4$) e 3,3% ($n = 1$) apresentaram-se positivos 60 e 180 dias após o diagnóstico, respectivamente. Em todos os casos foram apenas observadas monoinfecções ocasionadas por *P. vivax*. Os indivíduos convalescentes que apresentaram positividade no diagnóstico molecular foram, então, excluídos deste estudo ($n = 9$). Nenhum CE apresentou-se positivo por meio das técnicas utilizadas (microscopia e PCR).

Sendo assim, após a realização da PCR, os grupos de estudo foram compostos pelos n amostrais descritos na **Tabela 4**:

Tabela 4. Número de amostras após a realização do PCR diagnóstico

Casos	Controles	Agudos	Convalescentes		
	CE		30d	60d	180d
n°	28	61	41	20	29

CE= controles expostos

5.1.2.2 Características demográficas da população de estudo e sintomatologia

Após confirmação do diagnóstico parasitológico por meio da PCR, os indivíduos selecionados foram comparados quanto à idade e gênero, bem como em relação ao seu histórico de exposição (**Tabela 5**).

Em relação à idade, a qual poderia interferir em parâmetros imunológicos, foi observado que os grupos controles expostos (CE) e agudos foram homogêneos comparativamente. Sendo assim, foi inferido que qualquer variação observada nos dados obtidos possivelmente não seja atribuída à idade (Teste de Mann-Whitney; $p > 0,05$).

Os indivíduos pertencentes ao sexo masculino predominaram dentre os participantes do estudo (Teste do Qui-quadrado; $p > 0,05$). O grupo dos CE apresentou maior tempo de exposição à malária em áreas endêmicas (Teste de Mann-Whitney; $p < 0,05$), embora tenha exibido número de episódios pregressos de malária declarados semelhantes aos agudos (Teste de Mann-Whitney; $p > 0,05$). Dentre os grupos avaliados, pelo menos 54% dos indivíduos relataram ocorrência de episódios prévios de malária (Teste do Qui-quadrado; $p > 0,05$). Indivíduos expostos (CE), porém não infectados ($n = 15$), que relataram ocorrência de episódios pregressos de malária há pelo menos um ano, exibiram maior tempo decorrido entre o último episódio de malária e a data da coleta da amostra biológica, se comparado ao grupo dos agudos (Teste de Mann-Whitney; $p < 0,05$).

Tabela 5. Características demográficas da população e histórico de exposição à malária

Parâmetro	Grupos				
	CE (n=28)	agudos (n=61)	conv 30d (n=41)	conv 60d (n=20)	conv 180d (n=29)
Idade em anos	34,5	30,0	30,0	29,0	34,0
Mediana (IQR)	(30,0-44,0)	(23,0-44,5)	(23,5-43,5)	(22,5-45,8)	(20,0-44,0)
Gênero masculino	16 (57%)	44 (72%)	34 (83%)	14 (70%)	17 (59%)
n (%)					
Anos de exposição à malária	34,0	26,0	26,0	24,0	23,0
Mediana (IQR) #	(28,5-42,5)	(19,3-35,8)	(20,0-35,0)	(18,0-30,0)	(18,0-38,3)
Episódios progressos de malária	4,4 (±11,6)	4,5 (±6,5)	4,6 (±5,8)	3,0 (±3,5)	3,0 (±4,0)
Média (SD)					
≥ 1 malária prévia	15 (54%)	38 (62%)	32 (78%)	14 (70%)	17 (59%)
n (%)					
Anos desde a última malária	12,8	7,4	6,8	8,9	5,7
Média (95% CI)* #	(10,1-15,6)	(4,6-10,1)	(4,1-9,5)	(3,7-14,0)	(2,0-9,4)

IQR = intervalor interquartil; SD = desvio padrão; n° = número; CI = intervalo de confiança; CE = controles expostos; conv = convalescentes.

*Para cálculo do tempo decorrido desde último episódio de malária foram considerados apenas indivíduos que relataram ≥ 1 episódios prévios da doença.

Foram observadas diferenças significativas dos CE em relação aos agudos ($p < 0,05$).

Para avaliar a influência de infecções maláricas progressas na densidade parasitária, indivíduos agudos foram subdivididos em primoinfectados ($n = 23$) e reportando mais que uma malária prévia ($n = 38$) (**Figura 11**). Indivíduos primoinfectados apresentaram maior taxa de parasitos circulantes (média = 4068 parasitos/mm³) (738,5 – 7398; 95% CI) quando comparados aos que relataram malárias anteriores (média = 1387 parasitos/mm³) (922,3 - 1852; 95% CI). Porém, essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$).

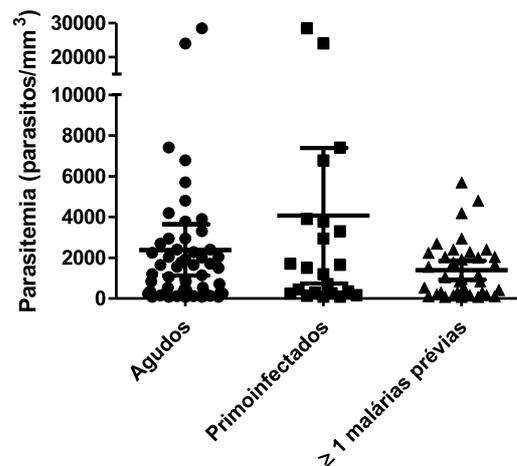


Figura 11. Densidade parasitária dos indivíduos com malária vivax aguda. Indivíduos infectados por *P. vivax* foram subdivididos em primoinfectados ou relato de ocorrência de episódios de ≥ 1 malárias prévias. O número de parasitos foi determinado pelo exame microscópico da gota espessa. Cada símbolo representa um participante individual e a barra horizontal indica média \pm S.E.M. A significância estatística entre os grupos foi investigada pelo teste de Kruskal-Wallis (com teste de Mann Whitney para comparações múltiplas entre primoinfectados e ≥ 1 malárias prévias). Agudos ($n = 61$), agudos e primoinfectados ($n = 23$) e agudos com ≥ 1 malárias prévias ($n = 38$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Sendo assim, no intuito de se conhecer melhor o perfil clínico dos participantes do estudo, especialmente durante a fase aguda da infecção, os mesmos foram também avaliados com relação à sintomatologia relatada nos últimos sete dias que precederam a coleta das amostras biológicas. Foi avaliada a presença/ausência de quinze sinais clínicos comumente presentes durante a fase eritrocítica da doença: febre, cefaléia, calafrios, fraqueza, tontura, dor abdominal, sudorese, artralgia, perda de apetite, náuseas, vômitos, lombalgia, mialgia, diarréia, dor nos hipocôndrios. Os indivíduos também foram questionados quanto à presença de qualquer outro sintoma não listado.

Dentre os sujeitos em fase aguda da infecção, destacaram-se a ocorrência de febre (84%), cefaleia (69%) e calafrios (51%) (**Figura 12**). Estes sintomas

caracterizam a clássica tríade sintomática característica da malária. Fraqueza (29%), tontura (25%), dor abdominal (24%) e sudorese (24%) também foram relatadas. Apesar da maioria dos sintomas terem desaparecido com o tratamento da infecção, alguns pacientes convalescentes de 30 dias relataram cefaléia, calafrio, fraqueza e perda de apetite. Se a persistência desses sintomas estava ou não relacionada diretamente à infecção malárica progressa, isso necessitaria ser melhor investigado.

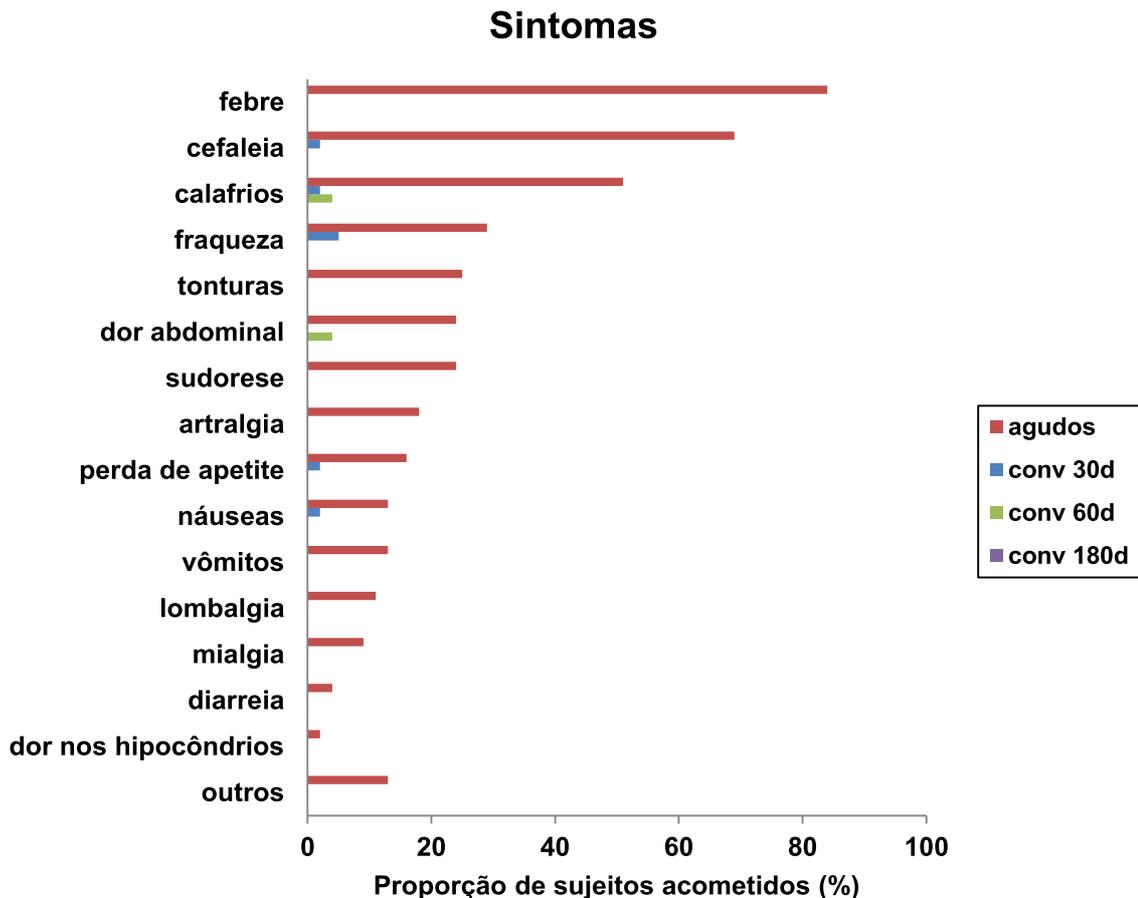


Figura 12. Percentual (%) de indivíduos apresentando sintomas comuns à fase eritrocítica da infecção malárica. Foram avaliadas as proporções de sujeitos afetados por estes sintomas durante o período da convalescença (30, 60 e 180 dias após o diagnóstico/tratamento).

Considerando que o período médio entre início do surgimento dos sintomas clínicos da doença e a busca pelo diagnóstico foi de 3 dias (2 – 4; 95% CI), foi avaliada nestes indivíduos a ocorrência de possíveis alterações hematológicas.

5.1.2.3 Características hematológicas

A anemia não grave é caracterizada em adultos por níveis de hemoglobina (Hb) entre 7,0 a 11,9 g/dL (mulheres) ou entre 7,0 a 12,9 g/dL (homens), enquanto a anemia grave é definida por níveis de Hb < 7,0 g/dL (WHO, 2015b). Dentre os

indivíduos objetos do estudo, cerca de 21% (13/61) apresentaram anemia não grave durante a fase aguda de malária vivax. Destes 13 pacientes anêmicos, dois permaneceram anêmicos durante o período de seguimento (2/13), o que sugere que a etiologia da anemia nesses pacientes poderia estar associada a outros fatores além da infecção malárica. Foi observado também que controles expostos apresentaram níveis de Hb superiores aos exibidos por indivíduos agudos e convalescentes (CE= 14,7; agudos 13,7 e conv de 30, 60 e 180 de cerca de 13,6 g/dL; Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,01$) (**Figura 13A**).

Não houve diferenças significativas nos valores médios de hematócrito (Hct) entre os grupos avaliados (**Figura 13B**) (Teste de Kruskal-Wallis; $p > 0,05$). Foi observado também que os pacientes descritos como anêmicos encontravam-se com hematócrito dentro dos limites de normalidade (35 - 45%). De uma maneira geral, hematócrito $< 20\%$ em adultos com densidade de parasitos no sangue periférico $> 10.000/ \text{mm}^3$ estão associados à anemia grave (WHO, 2015b). Nenhum dos indivíduos aqui avaliados se enquadrou neste critério.

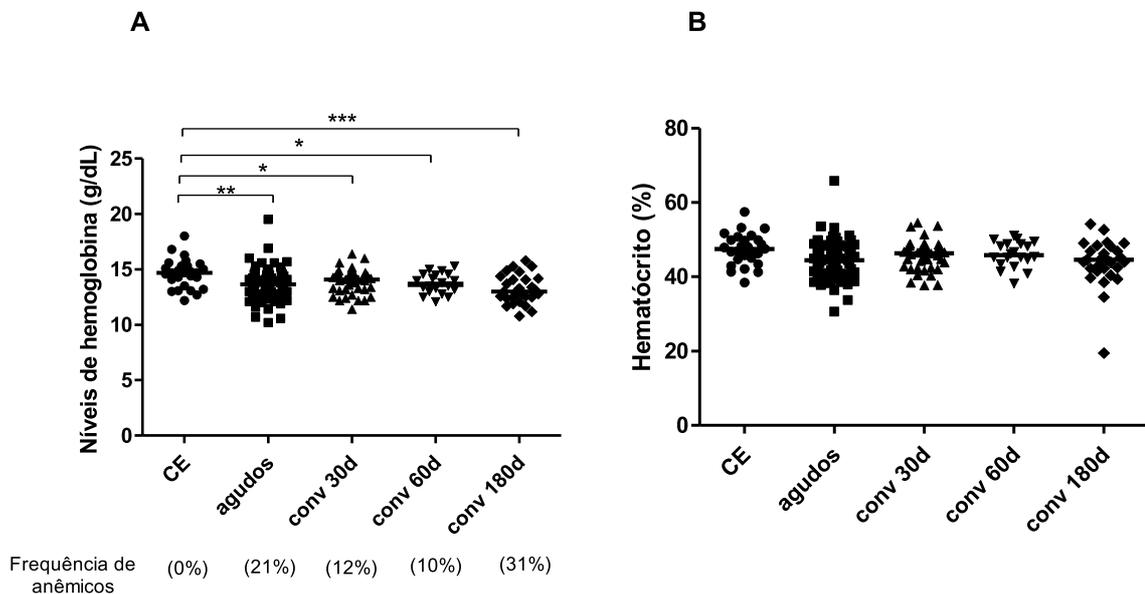


Figura 13. Níveis de hemoglobina (g/dL) (A) e hematócrito (%) (B) nos grupos de indivíduos de estudo. Cada símbolo representa um participante individual e a barra horizontal indica a mediana. A significância estatística entre os grupos foi investigada pelo teste de Kruskal-Wallis (com teste de Mann Whitney para comparações múltiplas entre os grupos). CE (controles expostos, $n = 28$), agudos ($n = 61$), após o diagnóstico (convalescentes “conv 30d”, “conv 60d” e “conv 180d”, $n = 41$, 20 e 29, respectivamente). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Plaquetopenia ou trombocitopenia é caracterizada como branda à moderada, quando a contagem de plaquetas (PLT) se encontra entre 50000 a 150000

plaquetas/mm³ de sangue. Já a plaquetopenia grave é caracterizada pela contagem de PLT < 50000/mm³ de sangue (WHO, 2015b). Quando foram avaliados indivíduos durante o episódio agudo de malária vivax, foi observado que o número absoluto de PLT foi significativamente menor nesse grupo comparado aos valores absolutos exibidos por indivíduos pertencentes aos grupos convalescentes e exposto (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$) (**Figura 14A**). Cerca de 75% (46/61) dos pacientes apresentaram-se trombocitopênicos durante a fase aguda da doença, dos quais, 15% (7/46) apresentaram trombocitopenia grave (PLT < 50000/mm³ de sangue). Conforme ilustrado na **Figura 14B**, a condição de plaquetopênico não foi influenciada por infecções progressas de malária.

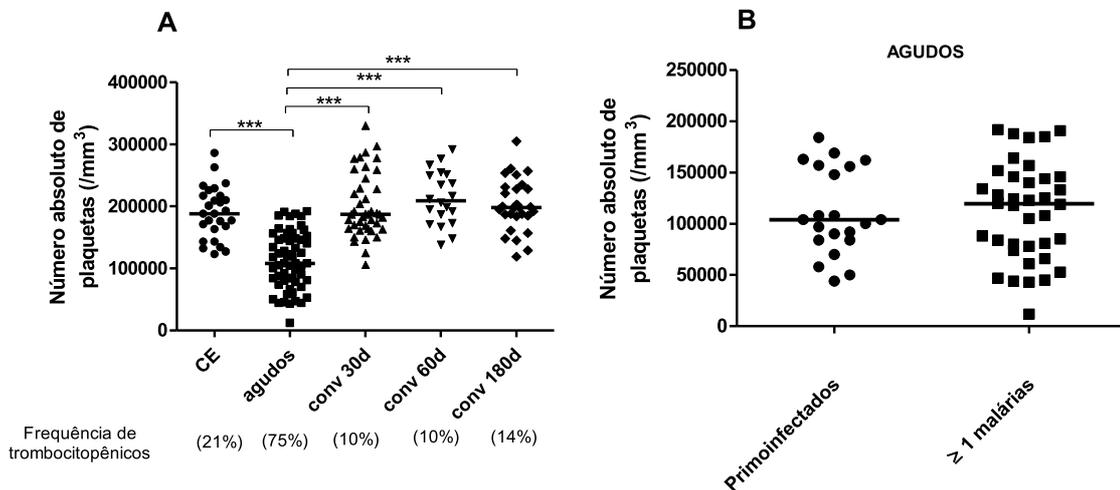


Figura 14. Número absoluto de plaquetas (/mm³) observado nos grupos avaliados (A). Em (B), os indivíduos agudos subdivididos conforme condição de primoinfectados (n = 23) ou relato de episódios de ≥ 1 malárias prévias (n = 38). Cada símbolo representa um participante individual e a barra horizontal indica a mediana. A significância estatística entre os grupos foi investigada pelo teste de Kruskal-Wallis (com teste de Mann Whitney para comparações múltiplas entre os grupos). CE (controles expostos, n = 28), agudos (n = 61), após o diagnóstico (convalescentes “conv 30d”, “conv 60d” e “conv 180d”, n = 41, 20 e 29, respectivamente). *** $p < 0,001$.

Alterações nas contagens absolutas de leucócitos, monócitos e linfócitos também são frequentemente observadas durante a fase aguda de malária. Neste sentido, a leucopenia é caracterizada pela contagem absoluta < 4500 leucócitos/mm³. Esta alteração foi detectada em aproximadamente 34% (21/61) dos casos agudos de malária vivax aqui estudados (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$) (**Figura 15A**). O número médio de monócitos também esteve reduzido em indivíduos agudos, se comparados aos convalescentes e expostos (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$), porém, com valores médios situados dentro do limite de

Com o objetivo de investigar se os níveis de parasitos circulantes poderiam modular as alterações hematológicas verificadas nos indivíduos do estudo, foi verificada a existência de possíveis correlações entre estas variáveis. Correlação entre parasitemia e alterações hematológicas foi verificada somente em relação ao número de plaquetas. Nesse caso, quanto maior o número de parasitos, menor a taxa de plaquetas circulantes (Spearman $r = - 0,33$; $p < 0,05$) ($n = 59$) (**Figura 16**). Os demais parâmetros hematológicos avaliados neste estudo não exibiram correlação com o número de parasitos circulantes no sangue periférico.

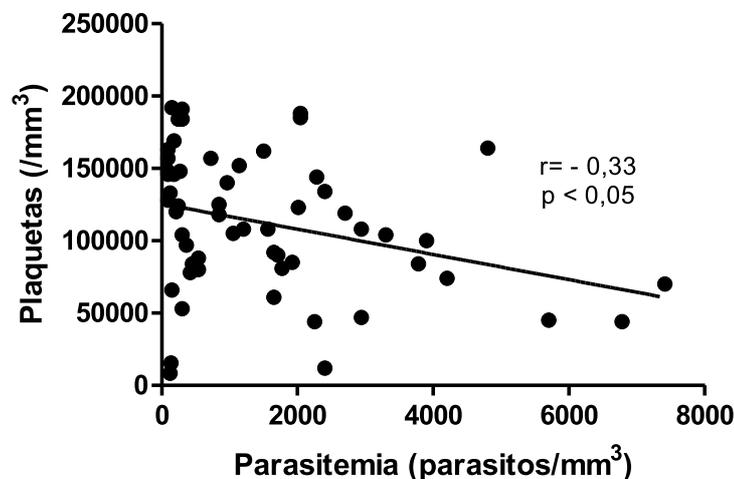


Figura 16. Correlação entre parasitemia (parasitos/mm³) e número absoluto de plaquetas (/mm³) durante o episódio agudo de malária vivax. As associações foram determinadas pelo coeficiente de correlação de Spearman.

5.1.3 Discussão

A malária humana apresenta amplo espectro clínico desde infecções assintomáticas, malária não complicada e complicada, com presença inclusive de casos letais (GROBUSCH e KREMSNER, 2005). O desfecho clínico da infecção é parcialmente dependente do balanço entre imunidade protetora e imunopatologia (CHUA et al., 2013). Quando os sintomas clínicos estão presentes, estes são frequentemente inespecíficos, podendo ser facilmente confundidos com outras doenças febris tropicais tais como dengue, febre amarela e doença de Chagas, as quais, frequentemente ocorrem em regiões onde a malária é endêmica.

Na literatura são descritas uma série de variações em parâmetros hematológicos presentes durante a malária aguda, porém a ligação entre estas

alterações e as manifestações clínicas da doença não é completamente elucidada (RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2014).

Foi observado neste estudo que cerca de 21% dos indivíduos durante a fase aguda de malária vivax estavam anêmicos. No entanto, trabalhos apontam que os níveis de hemoglobina frequentemente se regularizam após a resolução/tratamento da infecção malárica (DOUGLAS et al., 2012). Desta maneira, sugere-se que a persistência da anemia em alguns indivíduos convalescentes (cerca de 15%) pertencentes a este estudo esteja atribuída a outras causas não relacionadas à malária, tais como genética, má nutrição (FERREIRA et al., 2007) e/ou ocorrência de parasitoses intestinais (CARDOSO et al., 1994). A anemia é uma das principais complicações hematológicas associadas à malária, especialmente dentre primoinfectados, crianças menores de 5 anos e grávidas (MENENDEZ, FLEMING e ALONSO, 2000), mas também pode ser verificada em indivíduos adultos como os participantes deste estudo. A patogênese da anemia durante a infecção plasmodial não está completamente elucidada. Contudo, acredita-se que seja um processo multifatorial influenciado pela ruptura das hemácias parasitadas, com consequente liberação de parasitos e restos celulares na circulação, determinando a ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (LAMIKANRA et al., 2007). Aliado a este fator encontra-se a acelerada remoção de eritrócitos infectados e não infectados pelo sistema imune (PRICE et al., 2001) e a disfunção dos mecanismos envolvidos na hematopoiese (ABDALLA, 1988; LAYEZ et al., 2005; STERKERS et al., 2007; AWAH et al., 2009; AWAH et al., 2011). No Brasil, onde infecções ocasionadas por *P. vivax* são predominantes, a anemia tem sido relatada em cerca 25% dos pacientes durante o episódio agudo de malária (GUIMARÃES et al., 2016).

Foi observado neste trabalho que cerca de 75% dos pacientes com malária vivax apresentaram-se trombocitopênicos no momento do diagnóstico, sendo que destes 15% encontraram-se com trombocitopenia grave. Conforme esperado, essa condição foi naturalmente revertida após o tratamento da infecção. Portanto, os dados aqui representados reforçam estudos anteriores que demonstraram que os níveis de plaquetas tendem a se normalizar após o diagnóstico/tratamento da malária (LACERDA, 2007; LACERDA et al., 2011; LACERDA et al., 2012). Além disso, não foi observada associação entre plaquetopenia e ocorrência de episódios prévios de malária. Parece que a ocorrência de malárias prévias não faz com que esta alteração hematológica ocorra de forma mais branda.

A trombocitopenia foi exaustivamente investigada e confirmada durante a malária falciparum e vivax (MOULIN et al., 2003; ERHART et al., 2004; LACERDA, 2007), ocorrendo em cerca de 24 a 94% dos casos agudos (LACERDA et al., 2011; MARGONO et al., 2016), o que corrobora os resultados aqui representados. Dentre os mecanismos possivelmente atribuídos a este fenômeno estão a destruição periférica induzida pela adesão de plaquetas aos antígenos parasitários (LADHANI et al., 2002), a remoção excessiva pelo baço (BEALE et al., 1972; SKUDOWITZ et al., 1973) e o consumo destas durante a coagulopatia intravascular disseminada (CID) (ESSIEN, 1989). Pesquisas apontam que a redução nos níveis basais de plaquetas seja um eficiente marcador no diagnóstico de infecções plasmodiais em indivíduos expostos à malária (GERARDIN et al., 2002; MAHMOOD e YASIR, 2008; MARGONO et al., 2016).

Foi observada também correlação negativa entre a parasitemia dos pacientes durante a fase aguda da doença e número absoluto de plaquetas. Esta correlação confirmou os resultados de outros estudos conduzidos no Brasil (LACERDA, 2007; LACERDA et al., 2011; RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2014). Apesar disso, trabalhos apontam que a importância desta relação deverá ser melhor elucidada no contexto da malária vivax (LACERDA et al., 2012). Demais parâmetros hematológicos não apresentaram relação com a carga parasitária durante a fase aguda da doença, conforme também observado por Rodrigues-da-Silva e colaboradores (2014).

No que diz respeito aos linfócitos, cerca de 59% dos indivíduos durante a malária vivax apresentaram-se linfopênicos, sendo que, durante a convalescença, os valores absolutos se normalizaram. A ocorrência de linfopenia é frequentemente observada durante infecções ocasionadas, tanto por *P. vivax*, quanto por *P. falciparum* (TANGPUKDEE et al., 2008), que parece afetar particularmente a população de células T CD3⁺, podendo ser associada à apoptose de tais células (KERN et al., 2000). Outros estudos sugerem a possível realocação dos linfócitos para os sítios de inflamação (ELHASSAN et al., 1994), seguido de reemergência destas células após a cura da doença (HVIID et al., 1997).

Neste trabalho foi observada redução dos monócitos durante a malária vivax, se comparado aos convalescentes, porém, com valores médios absolutos situados dentro do limite de normalidade para este tipo celular. Durante o episódio agudo de malária é comum à ocorrência de hiperplasia do sistema retículo endotelial

(ABDALLA e PASVOL, 2004), com monocitose, que representa o aumento do número de monócitos (EL-SHOURA, 1993; MAINA et al., 2010; AKHTAR et al., 2012). Apesar disso, estudos indicam que eritrócitos infectados por *Plasmodium* modulam a função de monócitos, macrófagos e células dendríticas mielóides, tanto através da adesão à superfície destas células, quanto por meio de antígenos parasitários como hemozoína, o que compromete os mecanismos de defesa do hospedeiro (URBAN e ROBERTS, 2002).

Na ausência de uma definição específica para malária grave induzida por *P. vivax*, a Organização Mundial da Saúde (OMS) adota os critérios definidos para *P. falciparum* (exceto parasitemia), a fim de categorizar malária complicada dentre pacientes com malária vivax (WHO, 2015b). O diagnóstico de malária vivax grave inclui uma ou mais das seguintes complicações, definidas na presença de parasitemia sanguínea positiva, são estas: **1)** condições neurológicas (coma, convulsões repetidas ou perda de consciência); **2)** condições hematológicas, particularmente anemia grave ($< 7,0$ g/dL), plaquetopenia grave ($< 50000/\text{mm}^3$) e hemoglobinúria; **3)** sintomas sistêmicos como choque ou colapso circulatório e **4)** falência dos órgãos, que incluem a síndrome da angústia respiratória aguda, ruptura do baço, disfunção hepática, falência renal e icterícia (ALEXANDRE et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2015; WHO, 2015b; HOWES et al., 2016). Neste estudo, apenas a plaquetopenia grave foi observada dentre as desordens hematológicas graves induzidas por *P. vivax*. Não foram relatadas ocorrências de alterações neurológicas, sintomas sistêmicos, bem como sinais de falência dos órgãos. A fácil acessibilidade dos indivíduos pertencentes a este estudo aos serviços de saúde públicos nos municípios estudados possivelmente tenha evitado o agravamento do quadro clínico destes pacientes, o que é refletido no curto período médio entre o início da sintomatologia e a busca pelo diagnóstico/tratamento da malária (3 dias).

Na literatura, não foram observados relatos de mortes dentre pacientes que apresentaram exclusivamente contagem de plaquetas abaixo de $50000/\text{mm}^3$, mesmo dentre indivíduos infectados por *P. falciparum*. Neste sentido, apesar da trombocitopenia grave ser uma complicação descrita pela OMS, acredita-se que não deva ser considerada por si só um indicador de gravidade para a malária (LACERDA et al., 2012). Baseado nesta hipótese, as infecções agudas aqui avaliadas trataram-se apenas de episódios de malária vivax não complicada.

Em resumo, foi observada a associação entre ocorrência de alterações hematológicas e o diagnóstico positivo de malária vivax dentre os indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária na Amazônia Brasileira. Plaquetopenia, linfopenia e leucopenia foram as alterações comumente observadas na fase aguda da doença, sendo, de maneira geral, normalizadas durante o período da convalescença. O diagnóstico precoce dos casos de malária acompanhados neste estudo pode ter contribuído para o não agravamento dos sintomas clínicos da infecção, o que permitiu a redução da morbidade. No entanto, é importante enfatizar, em tempo, que comparar os resultados obtidos neste trabalho com o de outros estudos disponíveis na literatura é uma tarefa complicada vista a possibilidade de discrepância entre uma série de fatores, tais como, diferenças no perfil epidemiológico, condição nutricional, imunidade, fatores demográficos (idade, especialmente), tempo decorrido desde o aparecimento dos sintomas até a coleta/análise dos parâmetros e/ou ocorrência de co-infecções dentre os indivíduos avaliados (PRICE et al., 2001; ERHART et al., 2004; RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2014).

Referências

- ABDALLA, S. H. Peripheral blood and bone marrow leucocytes in Gambian children with malaria: numerical changes and evaluation of phagocytosis. *Annals of tropical paediatrics*, v. 8, n. 4, p. 250-258, 1988.
- ABDALLA, S. H.; PASVOL, G. *Malaria: a hematological perspective*. London: Imperial college press, 2004.
- ABDALLA, S. H.; WEATHERALL, D. J.; WICKRAMASINGHE, S. N.; HUGHES, M. The anaemia of *P. falciparum* malaria. *British journal of haematology*, v. 46, n. 2, p. 171-183, 1980.
- AKHTAR, S.; GUMASHTA, R.; MAHORE, S.; MAIMOON, S. Hematological changes in malaria: a comparative study. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v. 2, n. 4, p.15-19, 2012.
- ALEXANDRE, M. A.; FERREIRA, C. O.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. L.; MOURÃO, M. P. G.; LACERDA, M. V.; ALECRIM, M. G. C. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon – CDC. *Emerging Infectious Disease journal*, v. 16 n. 10, p. 1-4, 2010.
- ANDRADE, B. B.; REIS-FILHO, A.; SOUZA-NETO, S. M.; CLARÊNCIO, J.; CAMARGO, L. M.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria journal*, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2010.
- AWAH, N.; BALOGUN, H.; ACHIDI, E.; MARIUBA, L. A.; NOGUEIRA, P. A.; ORLANDI, P.; BERZINS, K. Antibodies to the *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RAP-2/RSP-2 in relation to anaemia in Cameroonian children. *Parasite immunology*, v. 33, n. 2, p. 104-115, 2011.

AWAH, N. W.; TROYE-BLOMBERG, M.; BERZINS, K.; GYSIN, J. Mechanisms of malarial anaemia: Potential involvement of the *Plasmodium falciparum* low molecular weight rho-try-associated proteins. *Acta tropica*, v. 112, n. 3, p. 295-302, 2009.

BAIRD, J. K. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends in parasitology*, v. 23, n. 11, p. 533-539, 2007.

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

BEALE, P. J.; CORMACK, J. D.; OLDREY, T. B. N. Thrombocytopenia in malaria with immunoglobulin (IgM) changes. *British Medical Journal*, v. 1, n. 5796, p. 345-349, 1972.

BRASIL-MS. Brasil tem o menor número de casos de malária dos últimos 35 anos. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/04/brasil-tem-o-menor-numero-de-casos-de-malaria-dos-ultimos-35-anos>>. Acesso em: 16 fev. 2017.

CARDOSO, M. A.; FERREIRA, M. U.; CAMARGO, L. M.; SZARFARC, S. C. Anaemia, iron deficiency and malaria in a rural community in Brazilian Amazon. *European journal of clinical nutrition*, v. 48, n. 5, p. 326-332, 1994.

CARLTON, J. M.; ADAMS, J. H.; SILVA, J. C.; BIDWELL, S. L.; LORENZI, H.; CALER, E.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S. V.; MERINO, E. F.; AMEDEO, P.; CHENG, Q.; COULSON, R. M. R.; CRABB, B. S.; DEL PORTILLO, H. Á.; ESSIEN, K.; FELDBLYUM, T. V.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; GILSON, P. R.; GUEYE, A. H.; GUO, X.; KANG'A, S.; KOOIJ, T. W. A.; KORSINCZKY, M.; MEYER, E. V. S.; NENE, V.; PAULSEN, I.; WHITE, O.; RALPH, A. S.; REN, Q. H.; SARGEANT, T. J.; SALZBERG, S. L.; STOECKERT, C. J.; SULLIVAN, A. S.; YAMAMOTO, M. M.; HOFFMAN, S. L.; WORTMAN, J. R.; GARDNER, M. J.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; FRASER-LIGGETT, C. M. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*, v. 455, n. 7214, p. 757-763. 2008.

CHUA, C. L. L.; BROWN, G.; HAMILTON, J. A.; ROGERSON, S.; BOEUF, P. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology?. *Trends in parasitology*, v. 29, n. 1, p. 26-34, 2013.

DA SILVA-NUNES, M.; CODEÇO, C. T.; MALAFRONTA, R. S.; DA SILVA, N. S.; JUNCANSEN, C.; MUNIZ, P. T.; FERREIRA, M. U. Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 79, n. 4, p. 624-635, 2008.

DOUGLAS, N. M.; ANSTEY, N. M.; BUFFET, P. A.; POESPOPRODJO, J. R.; YEO, T. W.; WHITE, N. J.; PRICE, R. N. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria journal*, v. 11, n. 1, p. 135, 2012.

EHRHART, L. M.; YINGYUEN, K.; CHUANAK, N.; BUATHONG, N.; LAOBOONCHAI, A.; MILLER, R. S.; MESHNICK, S. R.; GASSER, R. A. JR.; WONGSRICHANALAI, C. Hematological and clinical indices of malaria in a semi-immune population of Western Thailand. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 70, n. 1, p. 8-14, 2004.

EKVALL, H. Malaria and anemia. *Current opinion in hematology*, v. 10, n. 2, p. 108-114, 2003.

EL-SHOURA, S. M. Falciparum malaria in naturally infected human patients: IV - Ultrastructural changes in peripheral white blood cells. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, v. 68, n. 4, p. 169-175, 1993.

ELHASSAN, I. M.; HVIID, L.; SATTI, G.; AKERSTRÖM, B.; JAKOBSEN, P. H.; JENSEN, J. B.; THEANDER, T. G. Evidence of endothelial inflammation, T cell activation, and T cell reallocation in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 51, n. 3, p. 372-379, 1994.

ESSIEN, E. M. The circulating platelet in acute malaria infection. *British Journal of haematology*, v. 72, n. 4, p. 589-590, 1989.

- FERREIRA, M. U.; DA SILVA-NUNES, M.; BERTOLINO, C. N.; MALAFRONTA, R. S.; MUNIZ, P. T.; CARDOSO, M. A. Anemia and iron deficiency in school children, adolescents, and adults: a community-based study in rural Amazonia. *American journal of public health*, v. 97, n. 2, p. 237-239, 2007.
- GENTON, B.; D'ACREMONT, V.; RARE, L.; BAEA, K.; REEDER, J. C.; ALPERS, M. P.; MÜLLER, I. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med*, v. 5, n. 6, e127, 2008.
- GÉRARDIN, P.; ROGIER, C.; AMADOU, S. K.; JOUVENCEL, P.; BROUSSE, V.; IMBERT, P. Prognostic value of thrombocytopenia in African children with falciparum malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 66, n. 6, p. 686-691, 2002.
- GROBUSCH, M. P.; KREMSNER, P. G. Uncomplicated malaria. In *Malaria: Drugs, Disease and Post-genomic Biology*. Springer Berlin Heidelberg, p. 81-104, 2005.
- GUIMARÃES, M. G. S.; MARTINS, A. C.; SCHLOSSER, A. R.; CARDOSO, D. S.; MENEZES, C. C. R.; DOS SANTOS MALAFRONTA, R.; SILVA, A. L.; DE ARRUDA, E. F.; PINTO, W. J.; CAVASINI, C. E.; FERNANDES, L. N.; DA SILVA-NUNES, M. Prevalência de anemia em casos de malária não complicada em Mâncio Lima, Acre, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v. 45, n. 1, p. 77-86, 2016.
- HOWES, R. E.; BATTLE, K. E.; MENDIS, K. N.; SMITH, D. L.; CIBULSKIS, R. E.; BAIRD, J. K.; HAY, S. I. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 6, p.15-34, 2016.
- HVIID, L.; KURTZHALS, J. A. L.; GOKA, B. Q., OLIVER-COMMEY, J. O.; NKURUMAH, F. K.; THEANDER, T. G. Rapid reemergence of T cells into peripheral circulation following treatment of severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection and immunity*, v. 65, n. 10, p. 1090–1093, 1997.
- JAKEMAN, G. N.; SAUL, A.; HOGARTH, W. L.; COLLINS, W. E. Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitology*, v. 119, n. 2, p. 127-133, 1999.
- KERN, P.; DIETRICH, M.; HEMMER, C.; WELLINGHAUSEN, N. Increased levels of soluble Fas ligand in serum in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection and immunity*, v. 68, n. 5, p. 3061–3063, 2000.
- KOTEPUI, M.; PIWKHAM, D.; PHUNPHUECH, B.; PHIWKLAM, N.; CHUPEERACH, C.; DUANGMANO, S. Effects of malaria parasite density on blood cell parameters. *PloS one*, v. 10, n. 3, e0121057, 2015.
- LACERDA, M. V. G. Manifestações clínicas e patogênese da plaquetopenia na malária. 2007. 439 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Universidade de Brasília, Brasília.
- LACERDA, M. V. G.; MOURÃO, M. P. G.; COELHO, H. C. C.; SANTOS, J. B. Thrombocytopenia in malaria: who cares?. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, supl. 1, p. 52-63, 2011.
- LACERDA, M. V. G.; MOURÃO, M. P. G.; ALEXANDRE, M. A. A.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. L. M.; MARTINEZ-ESPINOSA, F. E.; FILHO, F. S. S.; BRASIL, P.; VENTURA, A. M. R. S.; TADA, M. S.; COUTO, V. S. C. D.; SILVA, A. R.; SILVA, R. S. U.; ALECRIM, M. G. C. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malaria journal*, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2012.
- LADHANI, S.; LOWE, B.; COLE, A. O.; KOWUONDO, K.; NEWTON, C. R. Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome. *British journal of haematology*, v. 119, n. 3, p. 839-847, 2002.

LAMIKANRA, A. A.; BROWN, D.; POCOTNIK, A.; CASALS-PASCUAL, C.; LANGHORNE, J.; ROBERTS, D. J. Malarial anemia: of mice and men. *Blood*, v. 110, n. 1, p. 18-28, 2007.

LAYEZ, C.; NOGUEIRA, P.; COMBES, V.; COSTA, F. T.; JUHAN-VAGUE, I.; DA SILVA, L. H. P.; GYSIN, J. *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage. *Blood*, v. 106, n. 10, p. 3632-3638, 2005.

LEE, S.H.; LOOAREESUWAN, S.; CHAN, J.; WILAIRATANA, P.; VANIJANONTA, S.; CHONG, S.M.; CHONG, B.H. Plasma macrophage colony-stimulating factor and P-selectin levels in malaria-associated thrombocytopenia. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 77, n. 2, p. 289-293, 1997.

MAHMOOD, A.; YASIR, M. Thrombocytopenia: a predictor of malaria among febrile patients in Liberia. *Journal of Infectious Diseases*, v. 14, p. 41-44, 2008.

MAINA, R. N.; WALSH, D.; GADDY, C.; HONGO, G.; WAITUMBI, J.; OTIENO, L.; JONES, D.; OGUTU, B. R. Impact of *Plasmodium falciparum* infection on haematological parameters in children living in Western Kenya. *Malaria journal*, v. 9 n. 3, S4, 2010.

MARGONO, S.; LUBIS, B.; PASARIBU, S.; WIJAYA, H.; PASARIBU, A. P. The correlation between platelet count and parasite density in children with malaria infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 6, n. 3, p. 199-203, 2016.

MENDIS, K.; SINA, B. J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 64, n. 1-2 suppl, p. 97-106, 2001.

MENENDEZ, C.; FLEMING, A. F.; ALONSO, P. L. Malaria-related anaemia. *Parasitology today*, v. 16, n. 11, p. 469-476, 2000.

MOULIN, F.; LESAGE, F.; LEGROS, A. H.; MAROGA, C.; MOUSSAVOU, A.; GUYON, P.; MARC, E.; GENDREL, D. Thrombocytopenia and *Plasmodium falciparum* malaria in children with different exposures. *Archives of disease in childhood*, v. 88, n. 6, p. 540-541, 2003.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; KOCHAR, D. K.; ALONSO, P. L.; DEL PORTILLO, H. A. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet infectious diseases*, v. 9, n. 9, p. 555-566, 2009.

PIGUET, P. F.; KAN, C. D.; VESIN, C. Thrombocytopenia in an animal model of malaria is associated with an increased caspase-mediated death of thrombocytes. *Apoptosis*, v. 7, n. 2, p. 91-98, 2002.

PRICE, R. N.; SIMPSON, J. Á.; NOSTEN, F.; LUXEMBURGER, C.; HKIRJAROEN TER KUILE, F.; CHONGSUPHAJASIDDHI, T.; WHITE, N. J. Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 65, n. 5, p. 614-622, 2001.

PRICE, R. N.; TJITRA, E.; GUERRA, C. A.; YEUNG, S.; WHITE, N. J.; ANSTEY, N. M. Vivax malaria: neglected and not benign. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 77, n. 6, p. 79-87, 2007.

RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; LIMA-JUNIOR, J. D. C.; ANTAS, P. R. Z.; BALDEZ, A.; STORER, F. L.; SANTOS, F.; BANIC, D. M.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. D. Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 2, p. 154-162, 2014.

SCOPEL, K. K.; FONTES, C. J.; NUNES, Á. C.; HORTA, M. F.; BRAGA, É. M. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malaria journal*, v. 3 n. 1, p. 1-8, 2004.

SIQUEIRA, A. M.; LACERDA, M. V.; MAGALHÃES, B. M.; MOURÃO, M. P.; MELO, G. C.; ALEXANDRE, M. A.; ALECRIM, M. G. C.; KOCHAR, D.; KOCHAR, S.; KOCHAR, A.; NAYAK, K.; DEL

PORTILHO, H.; GUINOVARTE, C.; ALONSO, P.; BASSAT, Q. Characterization of *Plasmodium vivax* - associated admissions to reference hospitals in Brazil and India. BMC medicine, v. 13, n. 1, p. 57, 2015.

SKUDOWITZ, R. B.; KATZ, J.; LURIE, A.; LEVIN, J.; METZ, J. Mechanisms of thrombocytopenia in malignant tertian malaria. British Medical Journal, v. 2, n. 5865, p. 515-518, 1973.

STERKERS, Y.; SCHEIDIG, C.; DA ROCHA, M.; LEPOLARD, C.; GYSIN, J.; SCHERF, A. Members of the low-molecular-mass rhoptry protein complex of *Plasmodium falciparum* bind to the surface of normal erythrocytes. Journal of Infectious Diseases, v. 196, n. 4, p. 617-621, 2007.

TANGPUKDEE, N.; YEW, H. S.; KRUDSOOD, S.; PUNYAPRADIT, N.; SOMWONG, W.; LOOAREESUWAN, S.; KANO, S.; WILAIRATANA, P. Dynamic changes in white blood cell counts in uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* malaria. Parasitology international, v. 57, n. 4, p. 490-494, 2008.

TAYLOR, S. M.; PAROBEEK, C. M.; FAIRHURST, R. M. Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. The Lancet infectious diseases, v. 12, n. 6, p. 457-468, 2012.

URBAN, B. C.; ROBERTS, D. J. Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells. Current opinion in immunology, v. 14, n. 4, p. 458-465, 2002.

WICKRAMASINGHE, S. N.; ABDALLA, S. H. Blood and bone marrow changes in malaria. Best Practice & Research Clinical Haematology, v. 13, n. 2, p. 277-299, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)^a, World Malaria Report 2016. Disponível em: <http://www.rbm.who.int/>. Acesso em: 01 nov. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)^b, Control and elimination of *Plasmodium vivax* malaria: a technical brief. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241509244/en/>. Acesso em: 05 mar. 2017.

Parte 5.2 Anticorpos e células B de memória circulantes de longa duração direcionadas aos antígenos de fase sanguínea de *Plasmodium vivax* (AMA-1 e MSP-9) em indivíduos expostos em regiões de baixa endemicidade de malária na Amazônia Brasileira

5.2.1 Introdução

A malária é uma doença parasitária ocasionada predominantemente por duas espécies de plasmódios, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* (WHO, 2015). Fora do continente Africano, *P. vivax* é a espécie de maior prevalência, sendo associado a cerca de 16 milhões de episódios clínicos (BHATT et al., 2015; WHO, 2015). No Brasil, *P. vivax* é atribuído a cerca de 85% dos casos de malária registrados na Amazônia Brasileira. Neste cenário epidemiológico, registros frequentes de complicações clínicas associadas à malária vivax (ALEXANDRE et al., 2010; ANSTEY et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2015) e evidências de que *P. vivax* seja menos susceptível a ações de controle e erradicação se comparado a *P. falciparum* (MUELLER, SHAKRI e CHITNIS, 2015), têm estimulado o desenvolvimento de uma vacina direcionada para esta espécie de plasmódio (RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2016).

Estudos soroepidemiológicos conduzidos mundialmente demonstraram que indivíduos relatando repetidos episódios clínicos de malária falciparum (DODOO et al., 2002; BRAGA et al., 2002; SCHOFIELD e MUELLER, 2006) ou malária vivax (MORAIS et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2006) podem desenvolver imunidade clínica, sendo frequente a ocorrência de infecções assintomáticas em áreas de média a alta endemicidades (COURA, SUÁREZ-MUTIS e LADEIA-ANDRADE, 2006; EKE, CHIGBU e NWACHUKWU, 2006; MALES et al., 2008). Apesar da imunidade capaz de prevenir a ocorrência de novas infecções ou controlar completamente o desenvolvimento de parasitemia sanguínea raramente ser alcançada, é de consenso que a interação entre anticorpos e células seja de essencial importância para o estabelecimento do equilíbrio entre parasito-hospedeiro (BULL et al., 1998; SCHOFIELD e MUELLER, 2006).

Entre as principais proteínas de *P. vivax* candidatas a compor uma vacina antimalárica baseada na indução de anticorpos destacam-se AMA-1 (*Apical Membrane antigen-1*) e MSP-9 (*Merozoite Surface Protein-9*). PvAMA-1 é uma proteína de micronemas, descrita como fundamental durante o processo de invasão

dos plasmódios às células do hospedeiro (revisto por REMARQUE et al., 2008). Elevados níveis de anticorpos contra PvAMA-1 têm sido descritos em indivíduos continuamente expostos à malária (POLLEY et al., 2004; CHELIMO et al., 2005; CORTÉS et al., 2005), os quais demonstraram ser capazes de controlar a parasitemia sanguínea durante a infecção por *P. vivax* (YILDIZ et al., 2011). Além disso, as proteínas de superfície de merozoítos (*Merozoite Surface Proteins – MSPs*), incluindo PvMSP-9, são expressas durante a esquizogonia e se tornam associadas à superfície dos merozoítos no curso do desenvolvimento do esquizonte (BARNWELL et al., 1999). PvMSP-9 tem se destacado como potencial candidato vacinal uma vez que anticorpos específicos contra esta proteína têm sido associados com a redução no risco de desenvolvimento de malária sintomática (STANISIC et al., 2013; CUTTS et al., 2014). Recentemente, a sequência de aa E795 a A808 da PvMSP-9 foi identificada *in silico* e validada como epítipo linear de células B, com potencial papel na indução de imunidade protetora (RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2016).

Apesar do papel dos anticorpos durante a malária ter sido bem caracterizado (MICHON, FRASER e ADAMS, 2000; MARSH e KINYANJUI, 2006; BIRYUKOV e STOUTE, 2014; BOYLE et al., 2015; FOTORAN et al., 2015), a necessidade contínua de reinfecções para manutenção de níveis de anticorpos circulantes e condição imune (LANGHORNE et al., 2008) sugere que a indução e manutenção de células B de memória (*Memory B Cells – MBCs*) seja incompleta ou defeituosa (LANGHORNE et al., 2008), o que corrobora os estudos realizados em modelos animais (WYKES et al., 2005; CARVALHO et al., 2007). No entanto, estudos conduzidos especialmente em áreas endêmicas para *P. falciparum* e, raramente, para *P. vivax* (WIPASA et al., 2010), têm demonstrado que crianças e adultos desenvolvem MBCs capazes de persistir por anos, mesmo na ausência de reinfecções (WIPASA et al., 2010; AYIEKO et al., 2013; NDUNGU et al., 2013). Outros estudos sugerem que a idade seja um importante fator capaz de modular a imunidade, uma vez que anticorpos específicos parecem ser perdidos rapidamente do soro de crianças após a cura da infecção (CAVANAGH et al., 1998; ACHTMAN et al., 2005; KINYANJUI et al., 2007; AKPOGHENETA et al., 2008), porém persistem durante longos períodos em adultos (TAYLOR et al., 1996; DRAKELEY et al., 2005). Sendo assim, é evidente a necessidade de entendimento dos fatores capazes

de modular o desenvolvimento e persistência de memória imunológica no intuito do desenvolvimento racional de vacinas.

O objetivo deste estudo foi investigar o desenvolvimento e longevidade das respostas de anticorpos e MBCs contra estes dois maiores candidatos vacinais de *P. vivax*, PvAMA-1 e PvMSP-9, em indivíduos expostos à malária vivax em áreas de baixa transmissão no Brasil.

5.2.2 Resultados

5.2.2.1 Características dos indivíduos do estudo

As respostas de anticorpos e células B de memória direcionadas aos peptídeos sintéticos de estágio sanguíneo PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808) foram investigadas em adultos residentes em três áreas endêmicas da Amazônia Brasileira. Indivíduos de ambos os sexos foram incluídos em um dos cinco grupos: expostos, porém não infectados (CE), infectados no momento do recrutamento (agudos) e indivíduos convalescentes (sem relatos de episódios de malária por pelo menos 30, 60 e 180 dias). As características dos participantes do estudo, tais como idade, gênero, anos de exposição à malária, incidência e tempo decorrido desde o último episódio de malária foram apresentadas na **Tabela 6**.

Tabela 6. Características demográficas e histórico de exposição à malária

Parâmetro	Grupos				
	CE (n = 21)	agudos (n = 57)	conv 30d (n = 41)	conv 60d (n = 20)	conv 180d (n = 27)
Idade em anos Mediana (IQR)	40,0 (30,0-47,5)	30,0 (23,5-44,5)	30,0 (23,5-43,5)	29,0 (22,5-45,8)	34,0 (22,0-43,0)
Gênero masculino % (n°)	67 (14)	74 (42)	83 (34)	70 (14)	56 (15)
Anos de exposição à malária Mediana (IQR)	33,5 (27,8-43,3)	26,0 (20,0-36,0)	26,0 (20,0-35,0)	24,0 (18,0-30,0)	25,0 (18,0-39,3)
Episódios progressos de malária Média (SD)	4,8 (±13)	4,3 (±6,5)	4,6 (±5,8)	3,0 (±3,5)	3,1 (±4,2)
≥ 1 malária prévia % (n°)	48 (10)	63 (36)	78 (32)	70 (14)	59 (16)
Anos desde a última malária Média (95% CI)*	12,4 (8,34-16,46)	7,2 (4,4-9,9)	6,8 (4,1-9,5)	8,9 (3,7-14)	5,6 (1,6-9,5)

CE= Controles expostos; conv= convalescentes; n°= número; IQR= intervalo interquartil; SD= desvio padrão; CI= intervalo de confiança. *Para cálculo do tempo decorrido desde último episódio de malária foram considerados apenas indivíduos que relataram ≥ 1 episódios prévios da doença.

Entre os CE (n = 21), 48% relataram ter sofrido um ou mais episódios prévios de malária enquanto 52% relataram não ter histórico da doença. Dentre os agudos, 63% dos indivíduos relataram episódios progressos de malária vivax e/ou falciparum. Uma vez que todos os sujeitos do estudo são migrantes provenientes de outras regiões endêmicas da Amazônia Brasileira, não foi possível determinar o número exato de episódios ocasionados exclusivamente por *P. vivax* ou *P. falciparum*. No momento do estudo, nenhum dos participantes pertencentes aos grupos dos CE e convalescentes estava infectado por *Plasmodium*, conforme determinado pela gota espessa e PCR. Todas as infecções agudas foram diagnosticadas por *P. vivax* e a parasitemia média observada foi de 2465 parasitos/ μL de sangue (1166–3765; 95% CI).

Embora os níveis de parasitemia não tenham sido significativamente influenciados pela ocorrência de malárias prévias ($p > 0,05$), indivíduos relatando não terem sofrido episódios prévios (n = 21) tenderam a apresentar maior número de parasitos circulantes que indivíduos com ≥ 1 episódios progressos relatados (n = 36) (**Figura 17**; média = 4274 (603,8–7943; 95% CI) versus média = 1488 parasitos/ mm^3 de sangue (1008 – 1967; 95% CI, respectivamente).

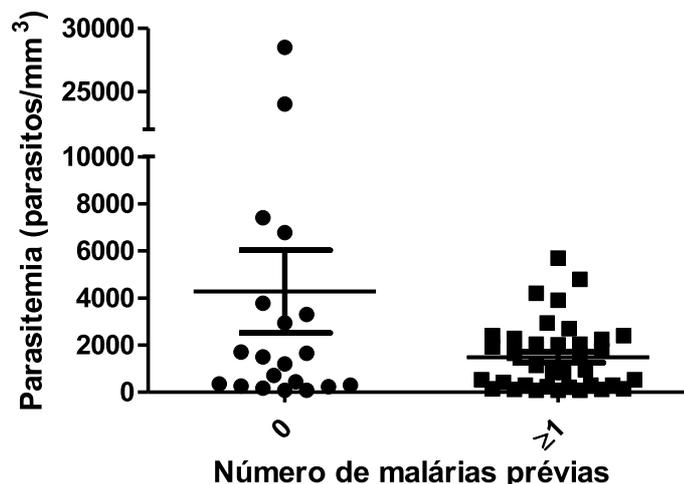


Figura 17. Níveis parasitêmicos apresentados pelos infectados segundo ocorrência de malárias prévias. O número de parasitos foi determinado pelo exame microscópico da gota espessa. Cada símbolo representa um participante individual e a barra horizontal indica média \pm S.E.M. A significância estatística entre os grupos foi investigada pelo teste de Mann Whitney. $P > 0,05$.

5.2.2.2 Anticorpos IgG naturalmente adquiridos reconhecendo os peptídeos PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808) foram observados por pelo menos 6 meses após a infecção aguda por *P. vivax*

Níveis de IgG plasmáticas são geralmente usados para mensurar exposição prévia, grau de imunidade humoral e reatividade cruzada com outros antígenos específicos (AMPOMAH et al., 2014). Primeiramente, foi mensurada a prevalência de respondedores e o perfil de reatividade de IgG para PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808) durante e após o tratamento de malária vivax (seguimento), assim como no grupo CE (**Figura 18**).

Para o peptídeo sintético PvAMA-1_(S290-K307), maior frequência de respondedores foi observada no grupo dos CE (62%) e convalescentes de 180 dias (70%). As frequências de indivíduos agudos e convalescentes 30 e 60 dias que apresentaram níveis detectáveis de anticorpos específicos contra PvAMA-1_(S290-K307) foram de 51%, 49% e 55%, respectivamente (**Figura 18A**). Em relação à PvMSP-9_(E795-A808), foi observado que uma maior proporção de indivíduos no grupo dos convalescentes 180d foram positivos para anticorpos se comparado aos CE, agudos e convalescentes (**Figura 18A**). Considerando-se apenas os respondedores positivos para cada peptídeo, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de anticorpos específicos (índice de reatividade – IR) entre qualquer um dos grupos avaliados (**Figuras 18B e C**). Os valores de IR variaram de 1,0 a 7,1 para PvAMA-1_(S290-K307), enquanto para PvMSP-9_(E795-A808) foram de 1,0 a 5,1 (**Figura 18C**). Indivíduos não expostos (CNE) não apresentaram anticorpos específicos contra os antígenos avaliados (dados não exibidos).

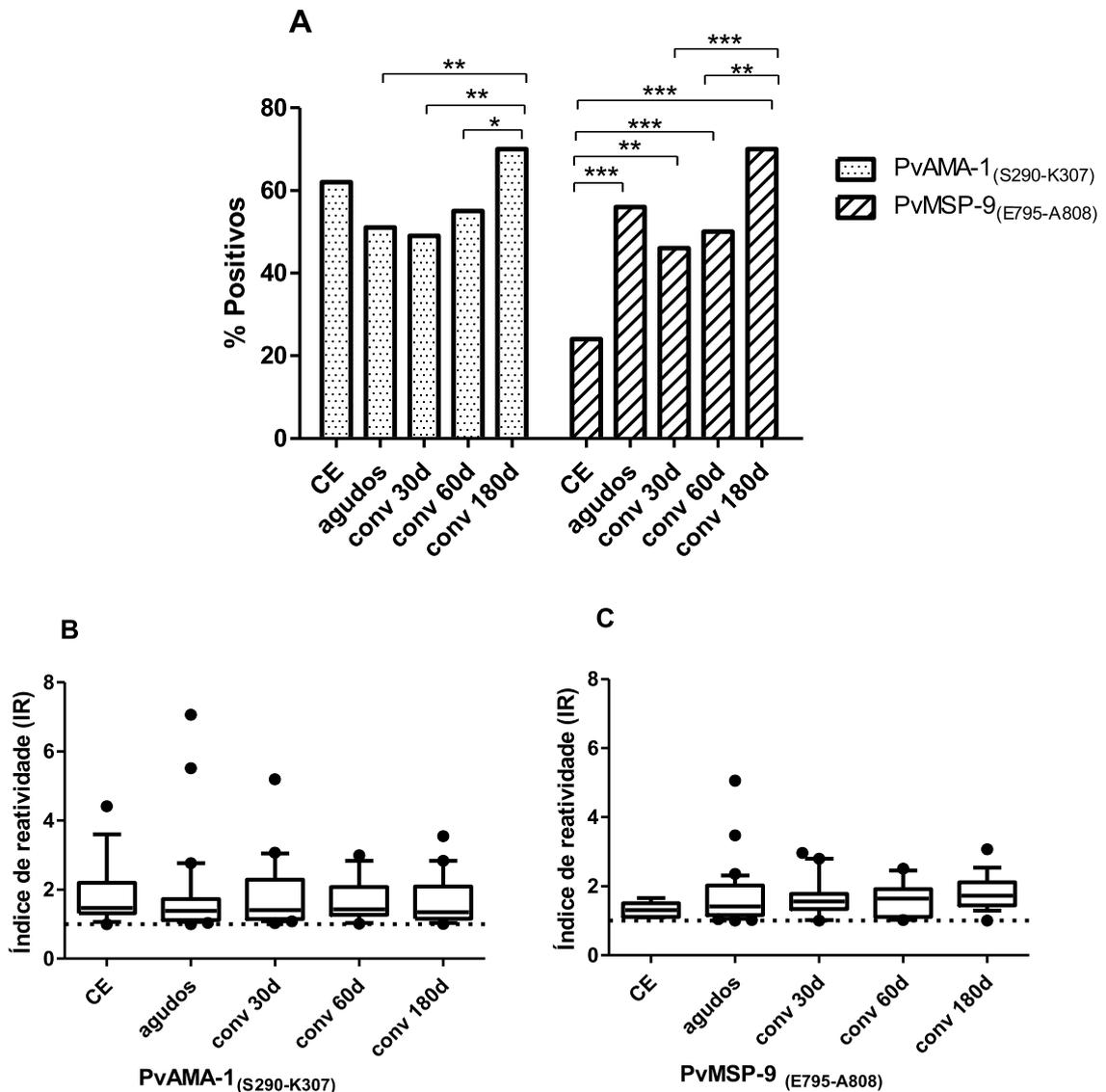


Figura 18. Imunogenicidade de PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808) durante o curso da infecção por *P. vivax*. Frequência de respondedores. As barras indicam a proporção de amostras respondedoras positivas para cada antígeno no respectivo tempo avaliado (A). Índice de reatividade de respondedores positivos ao longo do curso da infecção por *P. vivax* (B e C). Whiskers indicam os 10th ao 90th percentis e outliers são indicados pelos dots abaixo e acima dos boxes. A linha horizontal dentro dos boxes representam as medianas. Cada amostra de plasma foi testada em duplicata pelo ELISA. Significâncias estatísticas entre diferentes pontos foram avaliadas para cada antígeno pelo teste do Qui-quadrado (com teste de Fisher para comparações múltiplas para (A) e teste de Kruskal-Wallis (com teste de Mann Whitney para comparações múltiplas para (B) e (C)). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. CE (controles expostos, $n = 21$), agudos ($n = 57$), após o diagnóstico (convalescentes “conv 30d”, “conv 60d” e “conv 180d”, $n = 41, 20$ e 27 , respectivamente).

Para analisar a influência da infecção recente na produção de anticorpos e para determinar os níveis de IgG direcionadas a ambos os antígenos, foi comparado o perfil de anticorpos detectados durante o episódio de malária aguda com aqueles observados na fase de convalescência da doença (**Figuras 19A e B**). Três

observações importantes foram: **1)** para ambos os antígenos, a maioria dos indivíduos positivos para anticorpos ($IR > 1$) durante a fase aguda permaneceram positivos após 180 dias (exceto indivíduo 9 para o antígeno PvAMA-1_(S290-K307); indivíduos 9 e 11 para PvMSP-9_(E795-A808)); **2)** dos indivíduos que foram IgG negativos ($IR < 1$) durante a malária vivax, 50% (4/8 indivíduos) tornaram-se positivos para anticorpos PvAMA-1_(S290-K307) e 75% (3/4 indivíduos) tornaram-se positivos para PvMSP-9_(E795-A808) após 180 dias decorridos da infecção; **3)** não foram observadas mudanças significativas no perfil de anticorpos (IR) para respondedores positivos ao longo do tempo para ambos os antígenos avaliados, o que sugere produção das imunoglobulinas mantida com o decorrer do tempo.

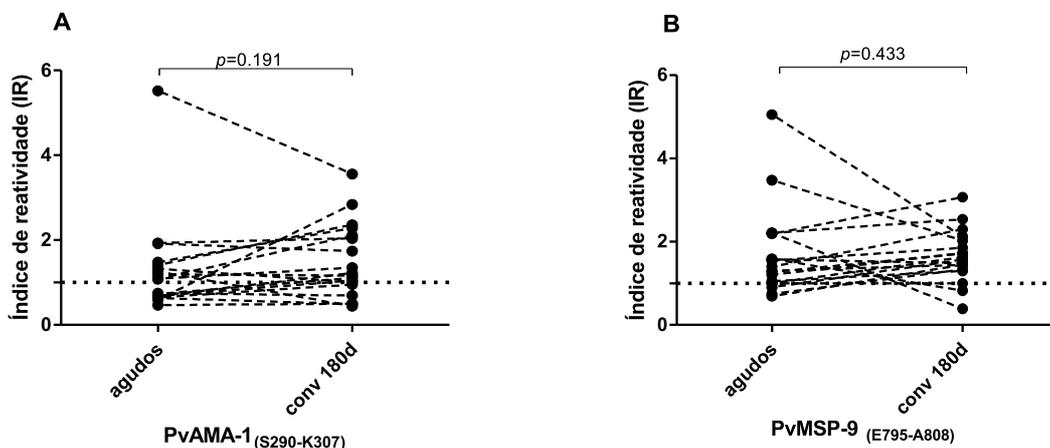


Figura 19. Mudanças temporais no índice de reatividade (IR) de IgGs específicas para PvAMA-1_(S290-K307) (A) e PvMSP-9_(E795-A808) (B) no plasma dos indivíduos durante o seguimento (agudo e conv 180d, n= 17 para PvAMA-1_(S290-K307) e n =16 for PvMSP-9_(E795-A808)). Cada linha pontilhada conectando distintos pontos representa um indivíduo. Cada amostra plasmática foi testada em duplicata pelo ELISA. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas pelo teste pareado de Wilcoxon.

5.2.2.3 Indivíduos expostos na Amazônia Brasileira exibem MBCs específicas para PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808)

Para investigar a ocorrência de MBCs malária específicas em indivíduos residentes em áreas de transmissão instável da Amazônia Brasileira, foi empregado um protocolo de ELISpot altamente sensível (JAHNMATZ et al., 2013). No entanto, o número de indivíduos disponíveis para esta análise foi limitado pela disponibilidade de PBMCs criopreservados (CE: n = 12; agudo: n = 20; conv 60d: n = 13; conv 180d: n = 18). Os resultados foram exibidos na **Figura 20** como número de ASCs antígeno específicas em um universo de 10^6 PBMCs (**Figuras 20A e B**) e como percentual

(%) de ASCs antígeno específicas (**Figuras 20C e D**). Para ambos os antígenos testados, ASCs específicas foram observadas em todos os grupos avaliados, porém, a magnitude das respostas não foi diferente (teste de Kruskal-Wallis; $p > 0,05$ para $ASC/10^6$ PBMCs e % ASCs). Para investigar se a ocorrência de malárias prévias poderia influenciar no número ou frequência de MBCs antígeno específicas, os indivíduos foram analisados separadamente conforme autodeclaração de terem apresentado um ou mais episódios pregressos da infecção, porém, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

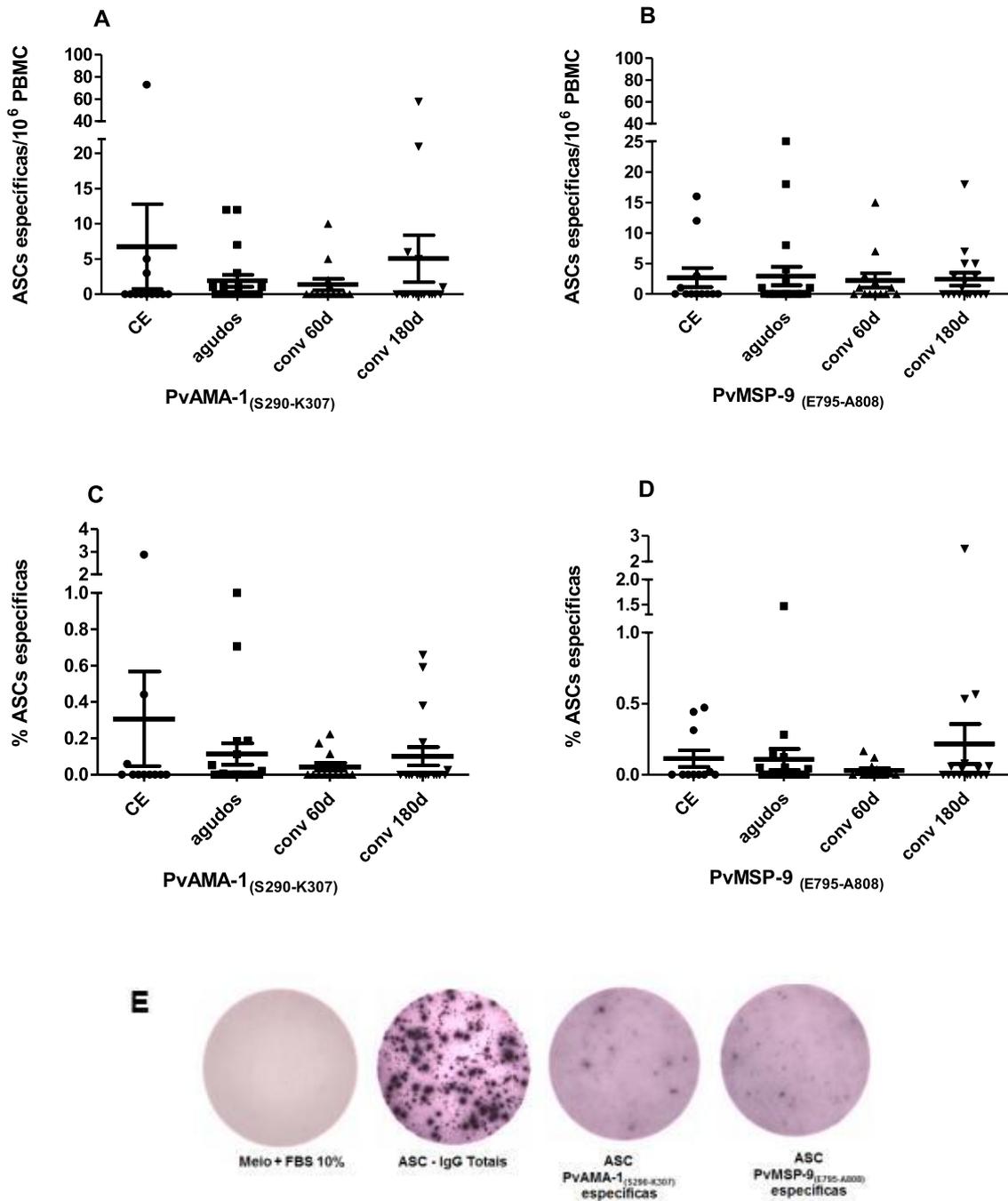


Figura 20. Resposta naturalmente adquirida de MBCs PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808) específicas ao longo da infecção por *P. vivax*. Resposta antígeno-específica dos indivíduos observadas pelo ELISpot foram expressas como ASCs antígeno específicas/ 10^6 PBMCs (A e B) e percentual (%) de ASCs específicas secretoras de IgG (C e D). Imagens representativas dos experimentos (Meio + FBS 10%); ASCs secretoras de IgG totais; ASCs secretoras de IgG PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808) específicas (E). A média de cada grupo foi indicada pela linha horizontal \pm S.E.M. Significância estatística entre diferentes pontos avaliados foi determinada para cada antígeno através do teste de Kruskal-Wallis (com teste de Mann Whitney para comparações múltiplas; $p > 0,05$).

Em seguida, para analisar a influência do decorrer do tempo na frequência de MBCs antígeno específicas, foram selecionados 14 indivíduos que tiveram PBMCs coletados durante a malária aguda e 180 dias após o tratamento (**Figuras 21A e B**). Para PvAMA-1_(S290-K307), não houve mudanças nas proporções de ASCs-IgG específicas negativas e positivas (64% e 36%, respectivamente) observadas nas fases aguda e de convalescença da doença. No entanto, mudanças nestes resultados foram evidentes quando os indivíduos foram avaliados individualmente. Para PvMSP-9_(E795-A808), foi observado que 4/9 dos indivíduos que não apresentaram MBCs específicas durante a malária aguda tornaram-se positivos durante a convalescença. Por outro lado, 40% (2/5 dos indivíduos) que eram inicialmente positivos para MBCs anti-PvMSP-9_(E795-A808), tornaram-se negativos 180 dias após o diagnóstico.

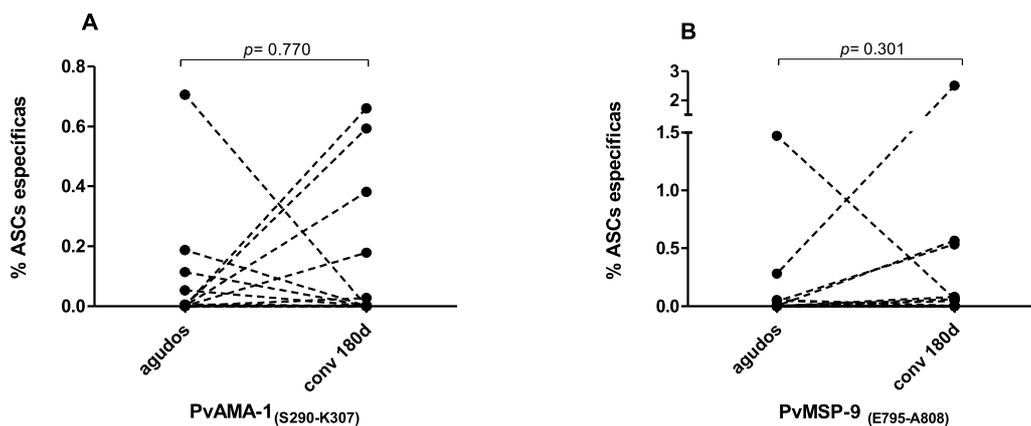


Figura 21. Mudanças temporais nas frequências de ASCs antígeno específicas para PvAMA-1_(S290-K307) (A) e PvMSP-9_(E795-A808) (B) em PBMCs dos indivíduos durante o seguimento (agudos e conv 180d, n = 14). Cada linha pontilhada conectando diferentes pontos representa um participante individual. Cada amostra de PBMCs foi testada em duplicata por ELISpot. A significância estatística entre os vários grupos foi determinada pelo teste pareado de Wilcoxon.

5.2.2.4 Associação entre a resposta de anticorpos e células B de memória ao longo do tempo

Posteriormente, foi conduzida uma análise sistemática entre a associação entre respostas de MBCs-IgGs específicas e anticorpos plasmáticos em âmbito individual. Participantes que foram previamente investigados para presença de anticorpos circulantes e MBCs PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808) específicos foram considerados para esta análise (**Figura 22**).

Não foi encontrada associação entre os níveis de anticorpos e frequência de MBCs específicos. No grupo dos CE (n = 9) e convalescentes de 180 dias (n = 16),

uma alta proporção de indivíduos exibiram anticorpos circulantes, mas não MBCs específicas. Encontraram-se nesta condição 45% dos CE e 56% dos conv 180d para PvAMA-1_(S290-K307). Já para PvMSP-9_(E795-A808) foram 50% dos conv 180d (**Figuras 22A e D**). Por outro lado, 16% e 21% dos indivíduos agudos (n = 19) foram positivos para MBCs específicas para PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808), respectivamente, porém negativos para anticorpos específicos (**Figura 22B**). Do mesmo modo, 15% dos convalescentes de 60 dias (n = 13) foram negativos para anticorpos PvMSP-9_(E795-A808) específicos, porém positivos para MBCs específicas para este antígeno (**Figura 22C**).

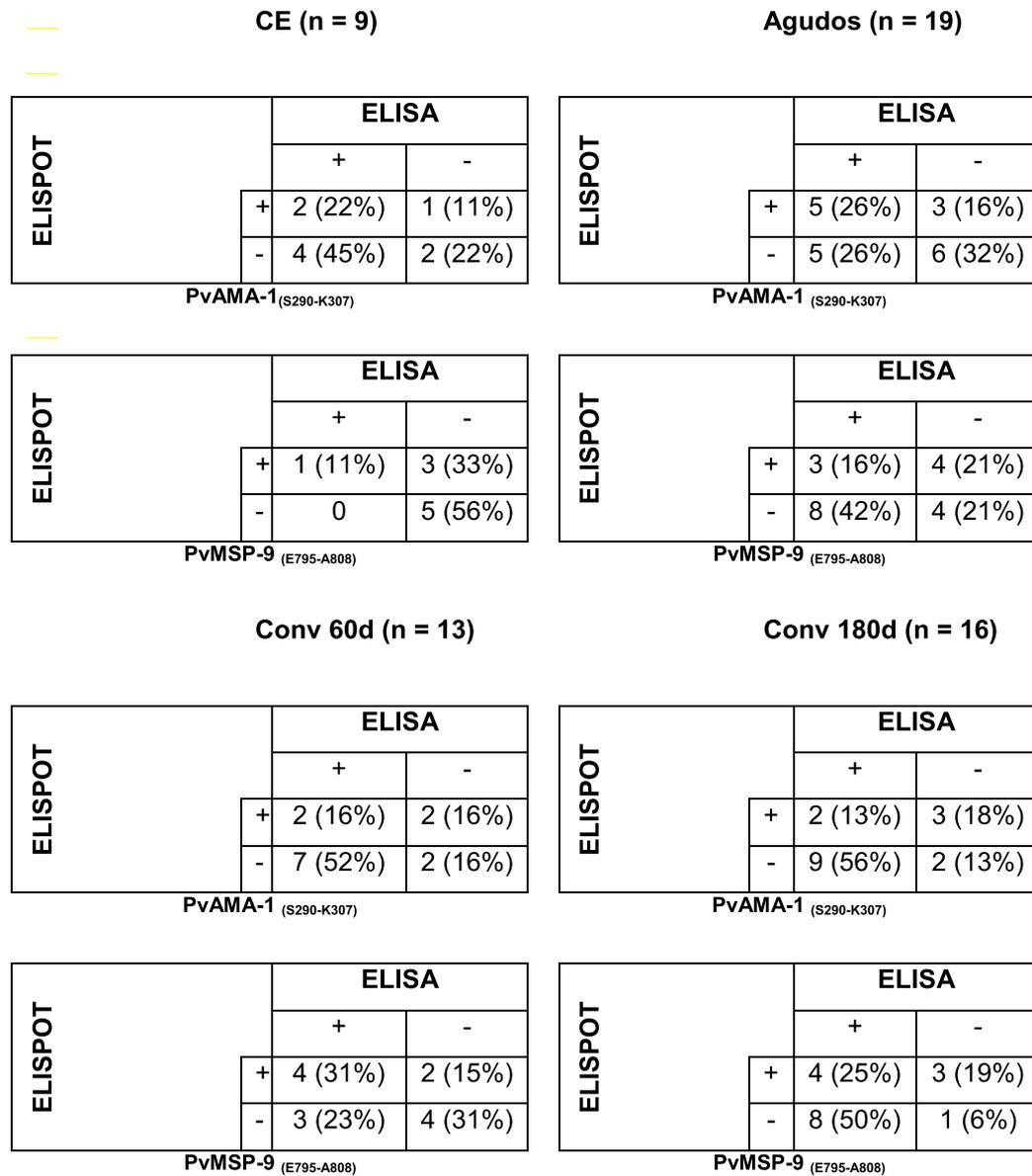


Figura 22. Associação entre respostas de ELISA e ELISpot para PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808). Foram exibidos o número e percentual (prevalência) de indivíduos que foram duplamente positivos (quadrante superior à esquerda), ELISA positivos, porém ELISpot negativos (quadrante inferior à esquerda), ELISA negativos, porém ELISpot positivos (quadrante superior à direita), ou duplamente negativos (quadrante inferior à direita). Controles expostos (CE) (A); agudos (B); conv 60d (C) e conv 180d (D).

Independente do grupo estudado, não foi observada correlação entre o índice de reatividade e a frequência de MBCs específicas para ambos os antígenos testados (**Figura 23**).

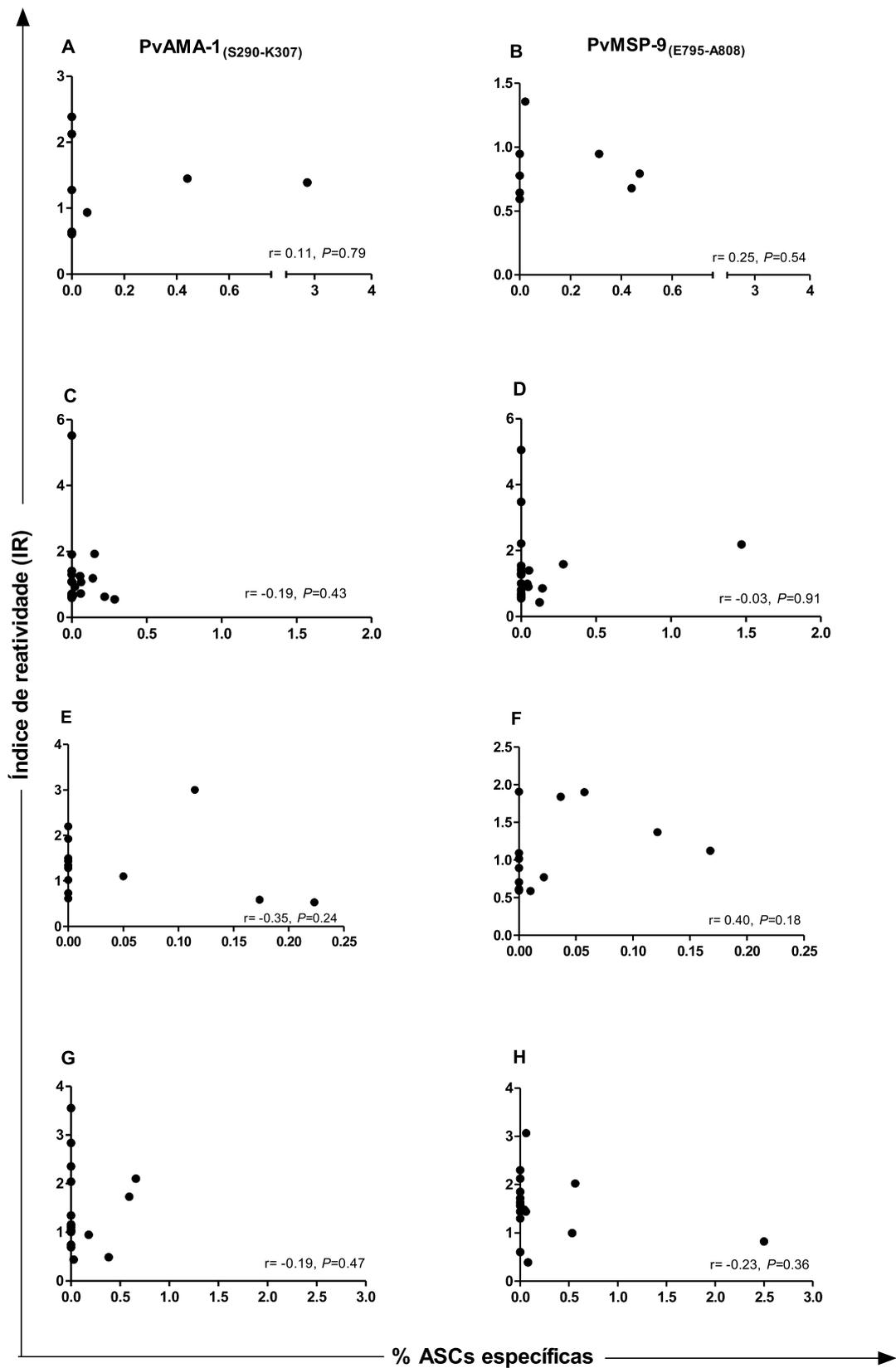


Figura 23. Correlação entre frequências de MBCs e níveis de anticorpos específicos para PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808). Independente do grupo estudado, não foi observada associação entre percentual de ASCs antígeno-específicas e índice de reatividade (IR) para ambos os antígenos testados em indivíduos expostos (A e B), indivíduos na fase aguda da infecção (C e D) ou indivíduos convalescentes para 60 (E e F) e 180 dias (G e H). A análise de correlação foi determinada utilizando a correlação de Spearman.

A heterogeneidade individual nos padrões das respostas de anticorpos e de MBCs encontra-se representada na **Tabela 7**. Cerca de 85% dos indivíduos apresentaram anticorpos e/ou MBCs específicas. No entanto, indivíduos apresentaram anticorpos específicos na ausência de MBCs (por exemplo, nos indivíduos 4, 13, 18, 20 e 21). Do mesmo modo, em casos nos quais anticorpos não foram detectáveis, MBCs específicas puderam ser observadas por meio da técnica do ELISpot (por exemplo, nos indivíduos 1, 8, 19 e 22).

Tabela 7. Perfil das respostas de anticorpos de células B de memória aos antígenos de *P. vivax* em amostras de fase aguda, convalescentes de 60 (“conv 60d”), 180 dias (“conv 180d”) e controlos expostos (CE).

ID*	Tipo	^{a)} Anos de exposição à malária	^{a)} Número de malárias prévias	^{a)} Episódios pregressos de malária (espécies)	^{a)} Tempo decorrido desde última malária (anos)	AMA-1 Ac (ELISA)	MSP-9 Ac (ELISA)	AMA-1 MBC (ELISpot)	MSP-9 MBC (ELISpot)	^{b)} N° Ags com MBC detectáveis (ELISpot)
1	conv 60d	26	15	<i>P.v.</i> ; <i>P.f.</i>	2			x		1
	conv 180d									0
2	agudo	33	3	<i>P.v.</i>	12			x	x	0
	conv 180d									2
3	conv 60d	30	1	<i>P.v.</i>	27	x	x	x		1
	conv 180d									0
4	agudo	12	2	<i>P.v.</i>	2					0
	conv 60d									0
5	agudo	64	7	<i>P.v.</i> ; <i>P.f.</i>	17	x	x			0
	conv 180d									2
6	conv 60d	20	3	<i>P.v.</i>	17		x	x	x	2
	conv 180d									1
7	agudo	18	4	<i>P.v.</i>	2		x	x		1
	conv 60d									1
	conv 180d									0
8	agudo	50	3	<i>P.v.</i>	28			x		1
	conv 60d									1
9	agudo	12	0	NA	NA	x	x	x	x	0
	conv 180d									2
10	agudo	29	3	<i>P.v.</i>	16	x		x	x	2
	conv 60d									0
11	agudo	22	0	NA	NA	x	x	x	x	2
	conv 60d									1
	conv 180d									1
12	agudo	25	6	<i>P.v.</i> ; <i>P.f.</i>	6	x	x			0
	conv 60d									1
13	conv 60d	24	0	NA	NA		x	x		0
	conv 180d									0
14	agudo	7	ND	ND	4	x	x	x	x	2
	conv 60d									2
	conv 180d									1
15	agudo	29	0	NA	NA	x		x	x	2
	conv 60d									0
	conv 180d									0
16	agudo	54	3	<i>P.v.</i>	6	x	x			0
	conv 60d									0
	conv 180d									1
17	agudo	22	0	NA	NA	x	x	x	x	2
	conv 180d									0

18	agudo	40	4	<i>P.v.;</i> <i>P.f.</i>	4		x			0
	conv 180d					x	x			0
19	agudo	22	2	<i>P.v.</i>	ND				x	1
	conv 180d							x	x	2
20	agudo	43	2	<i>P.v.</i>	20					0
	conv 180d					x	x			0
21	agudo	13	0	NA	NA	x	x			0
	conv 180d					x	x			0
22	agudo	17	0	NA	NA					0
	conv 180d					ND	ND		x	1
1	CE	8	0	NA	NA					0
2	CE	44	0	NA	NA	ND	ND			0
3	CE	27	0	NA	NA					0
4	CE	34	0	NA	NA	x				0
5	CE	40	5	<i>P.v.;</i> <i>P.f.</i>	9			x		1
6	CE	34	5 a 10	<i>P.v.;</i> <i>P.f.</i>	13	ND	ND			0
7	CE	37	>20	<i>P.v.;</i> <i>P.f.</i>	20	x	x		x	1
8	CE	30	1	<i>P.v.</i>	4	ND	ND			0
9	CE	33	10	<i>P.v.;</i> <i>P.f.</i>	6	x		x	x	2
10	CE	60	6	<i>P.v.</i>	17	x		x	x	2
11	CE	44	6	<i>P.v.;</i> <i>P.f.</i>	20	x				0
12	CE	21	2	<i>P.v.;</i> <i>P.f.</i>	9	x				0

^{a)}Informações auto declaradas; ^{b)}Número de antígenos de *P. vivax* aos quais os indivíduos possuem MBCs específicas. X indica resposta positiva ao respectivo antígeno; ND = não determinado, dado não disponível; NA = Não se aplica.

5.2.3 Discussão

O desenvolvimento de uma vacina efetiva e segura para humanos tem sido uma das maiores esperanças no combate à malária. Como *P. falciparum* é responsável por cerca de 90% das mortes atribuídas à malária anualmente, os estudos conduzidos com esta espécie de parasito são predominantes em populações expostas. No entanto, nos últimos anos, *P. vivax* tem recebido maior atenção por parte dos programas de saúde devido à sua capacidade de causar formas graves da doença. Além disso, a crescente resistência de *P. vivax* aos antimaláricos tem forçado autoridades locais a investirem em estratégias de controle direcionadas à doença em áreas endêmicas, incluindo estudos focados no desenvolvimento de vacinas.

Apesar dos avanços nos conhecimentos e nas tecnologias que norteiam o desenvolvimento de uma vacina, é alarmante o número de pesquisas em malária que fracassaram com este objetivo. Para explicar este insucesso, alguns estudos conduzidos em indivíduos infectados com *P. falciparum* têm sugerido que a geração e manutenção da memória imunológica *Plasmodium*-específica seja defeituosa (LANGHORNE et al., 2008; STRUIK e RILEY, 2004). Portanto, a compreensão dos mecanismos/fatores que norteiam a aquisição da imunidade antimalárica permanece fundamental para elaboração de estratégias de imunização.

No Brasil, onde *P. vivax* é responsável por cerca de 85% dos casos de malária registrados anualmente, este é o primeiro estudo que fornece evidências de que anticorpos naturalmente induzidos e MBCs específicas a importantes antígenos de estágio eritrocítico persistem após o tratamento em indivíduos expostos a baixos níveis de transmissão de malária na Amazônia Brasileira. Neste estudo, adultos expostos à infecção, porém sem evidência de relatos de malárias prévias ou infecções recentes (último episódio de malária \geq um ano) apresentaram anticorpos PvAMA-1_(S290-K307) específicos em maiores proporções, se comparados aos indivíduos em fase aguda ou convalescentes de 30 e 60 dias. Considerando que AMA-1 também é expressa nos esporozoítos, talvez justifique a alta prevalência de respondedores positivos dentre os sujeitos controles expostos (CE) que, embora sem infecção ativa no momento da amostragem, estão susceptíveis às picadas dos anofelinos em áreas endêmicas. Outra observação relevante foi a aumentada frequência de respondedores anti-PvAMA-1_(S290-K307) e anti-PvMSP-9_(E795-A808) no

grupo dos convalescentes de 180 dias, em relação aos agudos e grupos de 30 e 60 dias, sugerindo a ocorrência de soroconversão durante o segmento. Quando as respostas de anticorpos anti-PvAMA-1_(S290-K307) e anti-PvMSP-9_(E795-A808) foram avaliadas em amostras pareadas de soro (ou seja, provenientes do mesmo indivíduo) foi observado que, para ambos os antígenos testados, os IR relativos a respondedores positivos foram relativamente baixos (variando entre 1 e 7,1), porém estáveis ao longo do tempo. Estas observações estão em acordo com outros estudos que mostraram que os anticorpos podem persistir durante longos períodos de tempo na total ausência de reexposição ou infecção recente (WIPASA et al., 2010; BRAGA et al., 2002; CLARK et al., 2012). A persistência de anticorpos também pode ser relacionada à idade, como previamente sugerido por Akpogheneta et al. (2008). Especificamente, Akpogheneta et al. (2008) e outros estudos (KINYANJUI et al., 2007; KINYANJUI et al., 2003; ASITO et al., 2008) relataram respostas de curta duração em crianças jovens, onde a maturidade imunológica é incompleta, porém, não em adultos. Em crianças, a persistência de antígenos circulantes parece ser um importante fator para manutenção de anticorpos como observado em crianças assintomáticas de Gâmbia (AKPOGHENETA et al., 2008). Baseado nos baixos IR verificado para ambos os peptídeos testados quando comparados com os resultados obtidos em estudos conduzidos utilizando proteínas recombinantes (RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2016; MORAIS et al., 2006; LIMA-JUNIOR et al., 2008; SÁNCHEZ-ARCILA et al., 2015), pode-se especular que: 1) proteínas recombinantes são geralmente compostas por elevado número de aminoácidos e apresentam diversos epítomos, enquanto peptídeos são curtos e provavelmente possuem menor número de epítomos disponíveis para reconhecimento imune (14 aa para PvMSP-9_(E795-A808) versus 244aa para PvMSP9-RIRII₇₂₉₋₉₇₂ e 18aa para PvAMA-1_(S290-K307) versus 445aa para o ectodomínio de PvAMA-1). No entanto, o uso de peptídeos tem sido validado por estudos que demonstram a eficiência dos mesmos em induzirem imunidade humoral e/ou celular durante ensaios clínicos vacinais (AUDRAN et al., 2005; HERRERA et al., 2005; HERRERA et al., 2011); 2) a baixa endemicidade das áreas estudadas reflete os baixos números de episódios de malárias prévias, o que deve ser determinante na expressão de níveis de anticorpos específicos.

Em áreas de alta transmissão, o rápido *booster* de anticorpos têm sido observado após reexposição a diversos antígenos de *P. falciparum*, mesmo após

períodos prolongados de tempo. Assim, têm sido sugerido que a infecção malárica possa induzir a geração de MBCs específicas (MIGOT et al., 1993). No entanto, durante infecções por *P. vivax*, pouco se sabe a respeito da geração e manutenção da memória imunológica. Os níveis estáveis de anticorpos específicos detectados observados ao longo do tempo sugerem uma ocorrência infrequente de *booster* ou soroconversão durante o período de seguimento (180 dias). Como o padrão de resposta humoral dos indivíduos pertencentes a este estudo anteriormente à infecção é completamente desconhecido, visto que as MBCs necessitam em torno de 5 – 6 dias para se diferenciarem em células secretoras de anticorpos (ASCs) (WEISS et al., 2010), parece improvável a ocorrência de soroconversão exatamente entre o momento da infecção e o recrutamento (por volta de 3 dias após o início dos sintomas clínicos de malária). No entanto, Clark et al. (2012), avaliando amostras plasmáticas de indivíduos vivendo na Amazônia Peruana coletadas antes e durante a fase aguda de malária, mostraram que infecções ocasionadas por *P. falciparum* foram capazes de induzir aumento significativo na prevalência de respondedores, bem como nos níveis de IgG específicas anti-MSP-1 (CLARK et al., 2012), sugerindo portanto, soroconversão. Nahrendorf et al. (2014), durante estudos de imunização em humanos, sugeriram que mudanças na proporção de respondedores e níveis de IgG específicas para os antígenos PfCSP e PfMSP-1 são dependentes dos níveis de proteção prévia do indivíduo e do regime de desafio (esporozoítos ou formas eritrocíticas assexuadas). Os autores também sugeriram que baixas parasitemias (detectadas apenas por PCR) estão relacionadas a fortes respostas humorais se comparado às parasitemias patentes (NAHRENDORF et al.; 2014).

A malária grave é, principalmente, associada com infecções ocasionadas por *P. falciparum* e ocorre devido a uma série de mecanismos não observados frequentemente em outros plasmódios humanos, tal como aderência de parasitos de fase sanguínea aos vasos do endotélio (MILLER et al., 2002). Sendo assim, foi possível hipotetizar que diferenças biológicas observadas entre as espécies de *Plasmodium*, tal como, ausência de citoaderência na microvasculatura, poderiam contribuir para melhor indução da memória imunológica relacionada a esta espécie. Interessantemente, independente do antígeno avaliado, foram observadas frequências similares de MBCs específicas em todos os grupos de estudo, o que sugeriu que estas células podem ser geradas após poucas infecções ocasionadas por *P. vivax* e que as mesmas são de longa duração. Esse dado é suportado,

especialmente, pelo observado no grupo de CE, onde indivíduos que sofreram malária a mais de 12 meses ou que não relataram episódios progressos da doença apresentaram MBCs específicas para os antígenos testados. Os dados aqui representados são consistentes com o observado durante infecções ocasionadas por *P. falciparum* em áreas de baixa e instável transmissão de malária no mundo (WIPASA et al, 2010; AYIEKO et al., 2013; NDUNGU et al., 2012; CLARK et al., 2012), o que sugere que o comportamento biológico destes parasitos não influenciam nem são influenciados pela dinâmica da formação de memória imunológica. A ausência de MBCs e anticorpos em alguns indivíduos com infecções maláricas prévias, bem como a detecção de MBCs em indivíduos sem relato de malárias prévias ou infecções ativas, foram observados neste estudo e em outros trabalhos (WIPASA et al, 2010; CLARK et al., 2012), porém os fatores associados a estes achados não são claros.

É geralmente aceito que infecções maláricas constantes, como ocorrem tipicamente em áreas hiperendêmicas, podem interferir com o estabelecimento da memória imunológica (LANGHORNE et al., 2008; STRUIK e RILEY, 2004), provavelmente, por meio da deleção de células B específicas ou comprometimento da arquitetura dos centros germinativos, conforme demonstrado em estudos realizados em modelo animal (WYKES E GOOD, 2006; CARVALHO et al., 2007; HVIID, BARFOD e FOWKES, 2015). Em humanos, Weiss et al. (2010) demonstraram que em regiões de alta endemicidade, infecções maláricas agudas conduzem apenas a uma expansão temporária de MBCs malária-específicas seguida de contração do padrão inicialmente observado, sugerindo ineficiente imunidade humoral (WEISS et al., 2010). Os mecanismos envolvidos nestas observações são apenas parcialmente entendidos, porém, a variação antigênica e diversidade alélica entre diferentes cepas de *Plasmodium* possivelmente estão envolvidas neste processo (NOGARO et al., 2011; FERREIRA et al., 2004). Neste estudo, não foi observada correlação positiva entre anticorpos circulantes e a presença de MBCs no mesmo indivíduo. Do mesmo modo, alguns estudos têm mensurado significativos níveis de anticorpos na ausência de MBCs (DORFMAN et al., 2005; NOGARO et al., 2011), enquanto outros exibem presença de MBCs porém ausência de anticorpos circulantes (WIPASA et al, 2010; NDUNGU et al., 2013; AMPOMAH et al., 2014). Isto levanta o questionamento se esta discrepância reflete a falta de anticorpos circulantes e MBCs ou apenas a baixa sensibilidade dos

ensaios de ELISA e ELISpot utilizados. Neste sentido, Nogaro e colaboradores (2011) previamente questionaram se o ensaio de ELISpot é capaz de refletir o que ocorre *in vivo* quando uma MBCs encontra seu antígeno cognato (NOGARO et al., 2011). Isso permanece, portanto, por ser investigado.

Em resumo, este estudo demonstrou que os níveis de anticorpos circulantes ou o padrão de MBCs específicos para os peptídeos PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808) não foram significativamente afetados, seis meses após a infecção malárica ocasionada por *P. vivax*. Foi demonstrado também, que anticorpos específicos para *P. vivax* puderam ser observados na ausência de MBCs e vice-versa, conforme previamente observado para *P. falciparum* (REMARQUE et al., 2008; WIPASA et al, 2010) o que sugere a necessidade de desenvolvimento de outras metodologias que possam ser empregadas no intuito de confirmar se os resultados verificados em ensaios como ELISA e ELISpot refletem verdadeiramente o que ocorre no organismo vivo.

Referências

- ACHTMAN, A. H.; BULL, P. C.; STEPHENS, R.; LANGHORNE, J. Longevity of the immune response and memory to blood-stage malaria infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 297, p. 71-102, 2005.
- AKPOGHENETA, O. J.; DUAH, N. O.; TETTEH, DUNYO, S.; LANAR, D. E.; PINDER, M.; CONWAY, D. J. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. *Infection and immunity*, v. 76, n. 4, p. 1748-1755, 2008.
- ALEXANDRE, M. A.; FERREIRA, C. O.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. L.; MOURÃO, M. P. G.; LACERDA, M. V.; ALECRIM, M. G. C. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon – CDC. *Emerging Infectious Disease journal*, v. 16, n. 10, p. 1-4, 2010.
- AMPOMAH, P.; STEVENSON, L.; OFORI, M.F.; BARFOD, L.; HVIID, L. Kinetics of B Cell Responses to *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 in Ghanaian Women Naturally Exposed to Malaria Parasites. *The Journal of Immunology*, v. 192, n. 11, p. 5236-5244, 2014.
- ANSTEY, N. M.; DOUGLAS, N. M.; POESPOPRODJO, J. R.; PRICE, R. N. *Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Advances in Parasitology*, v. 80, p. 151-201, 2012.
- ANSTEY, N. M.; RUSSELL, B.; YEO, T. W.; PRICE, R. N. The pathophysiology of vivax malaria. *Trends in parasitology*, v. 25, n. 5, p. 220-227, 2009.
- ASITO, A. S.; MOORMANN, A. M.; KIPROTICH, C.; NG'ANG'A, Z. W.; PLOUTZ-SNYDER, R.; ROCHFORD, R. Alterations on peripheral B cell subsets following an acute uncomplicated clinical malaria infection in children. *Malaria journal*, v. 7, p. 238, 2008.
- AUDRAN, R.; CACHAT, M.; LURATI, F.; SOE, S.; LEROY, O.; CORRADIN, G.; DRUILHE, P.; SPERTINI, F. Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. *Infection and immunity*, v. 73, n. 12, p. 8017-8026, 2005.

AYIEKO, C.; MAUE, A. C.; JURA, W. G. Z. O.; NOLAND, G. S.; AYODO, G.; ROCHFORD, R.; JOHN, C. C. Changes in B Cell Populations and Merozoite Surface Protein-1-Specific Memory B Cell Responses after Prolonged Absence of Detectable *P. falciparum* Infection. PLoS ONE, v. 8, n. 6, e67230, 2013.

BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R.; DESIMONE, S. G.; PERLER, F.; INGRAVALLO, P. *Plasmodium vivax*, *P. cynomolgi*, and *P. knowlesi*: Identification of Homologue Proteins Associated with the Surface of Merozoites. Experimental Parasitology, v. 91, n. 3, p. 238-249, 1999.

BHATT, S.; WEISS, D. J.; CAMERON, E.; BISANZIO, D.; MAPPIN, B.; DALRYMPLE, U.; BATTLE, K. E.; MOYES, C. L.; HENRY, A.; ECKHOFF, P. A.; WENGER, E. A.; BRIËT, O.; PENNY, M. A.; SMITH, T. A.; BENNETT, A.; YUKICH, J.; EISELE, T. P.; GRIFFIN, J. T.; FERGUS, C. A.; LYNCH, M.; LINDGREN, F.; COHEN, J. M.; MURRAY, C. L.; SMITH, D. L.; HAY, S. I.; CIBULSKIS, R. E.; GETHING, P. W. The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. Nature, v. 526, n. 7572, p. 207-211, 2015.

BIRYUKOV, S.; STOUTE, J. A. Complement activation in malaria: friend or foe? Trends in molecular medicine, v. 20, n. 5, p. 293-301, 2014.

BOYLE, M. J.; REILING, L.; FENG, G.; LANGER, C.; OSIER, F. H.; ASPELING-JONES, H.; CHENG, Y. S.; STUBBS, J.; TETTEH, K. K.; CONWAY, D. J.; MCCARTHY, J. S.; MULLER, I.; MARSH, K.; ANDERS, R. F.; BEESON, J. G. Human antibodies fix complement to inhibit *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. Immunity, v. 42, n. 3, p. 580-590, 2015.

BRAGA, E. M.; BARROS, R. M.; REIS, T. A.; FONTES, C. J. F.; MORAIS, C. G.; MARTINS, M. S.; KRETTLI, A. U. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 66, n. 5, p. 461-466, 2002.

BULL, P. C.; LOWE, B. S.; KORTOK, M.; MOLYNEUX, C. S.; NEWBOLD, C. I.; MARSH, K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. Nature medicine, v. 4, n. 3, p. 358, 1998.

CARVALHO, L. J.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; PELAJO-MACHADO, M.; LENZI, H. L. Germinal center architecture disturbance during *Plasmodium berghei* ANKA infection in CBA mice. Malaria journal, v. 6, p. 59, 2007.

CAVANAGH, D. R.; ELHASSAN, I. M.; ROPER, C.; ROBINSON, V. J.; GIHA, H.; HOLDER, A. A.; HVIID, L.; THEANDER, T. G.; ARNOT, D. E.; MCBRIDE, J. S. A longitudinal study of type-specific antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in an area of unstable malaria in Sudan. The Journal of Immunology, v. 161, n. 1, p. 347-359, 1998.

CHELIMO, K.; OFULLA, A. V.; NARUM, D. L.; KAZURA, J. W.; LANAR, D. E.; JOHN, C. C. Antibodies to *Plasmodium falciparum* antigens vary by age and antigen in children in a malaria-holoendemic area of Kenya. The Pediatric Infectious Disease Journal, v. 24, n. 8, p. 680-684, 2005.

CLARK, E. H.; SILVA, C. J.; WEISS, G. E.; LI, S.; PADILLA, C.; CROMPTON, P. D.; HERNANDEZ, J. N.; BRANCH, O. H. *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory. Infection and immunity, v. 80, n. 4, p. 1583-1592, 2012.

CORTÉS, A.; MELLOMBO, M.; MASCIANTONIO, R.; MURPHY, V. J.; REEDER, J. C.; ANDERS, R. F. Allele specificity of naturally acquired antibody responses against *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1. Infection and immunity, v. 73, n. 1, p. 422-430, 2005.

COURA, J. R.; SUÁREZ-MUTIS, M.; LADEIA-ANDRADE, S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection - a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 101, n. 3, p. 229-237, 2006.

CUTTS, J. C.; POWELL, R.; AGIUS, P. A.; BEESON, J. G.; SIMPSON, J. A.; FOWKES, F. J. Immunological markers of *Plasmodium vivax* exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine*, v. 12, p. 150, 2014.

DODOO, D.; OMER, F. M.; TODD, J.; AKANMORI, B. D.; KORAM, K. A.; RILEY, E. M. Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production *in vitro* predict clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Infectious Diseases*, v. 185, n. 7, p. 971-979, 2002.

DORFMAN, J. R.; BEJON, P.; NDUNGU, F. M.; LANGHORNE, J.; KORTOK, M. M.; LOWE, B. S.; MWANGI, T. W.; WILLIAMS, T. N.; MARSH, K. B cell memory to 3 *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in a malaria-endemic area. *Journal of Infectious Diseases*, v. 191, n. 10, p. 1623-1630, 2005.

DRAKELEY, C. J.; CORRAN, P. H.; COLEMAN, P. G.; TONGREN, J. E.; MCDONALD, S. L.; CARNEIRO, I.; MALIMA, R.; LUSINGU, J.; MANJURANO, A.; NKYA, W. M.; LEMNGE, M. M.; COX, J.; REYBURN, H.; RILEY, E. M. Estimating medium-and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 14, p. 5108-5113, 2005.

EKE, R. A.; CHIGBU, L. N.; NWACHUKWU, W. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium* infection in a suburb of Aba Town, Nigeria. *Annals of African Medicine*, v. 5, n. 1, p. 42-45, 2006.

FERREIRA, M. U.; DA SILVA NUNES, M.; WUNDERLICH, G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 11, n. 6, p. 987-995, 2004.

FOTORAN, W. L.; SANTANGELO, R. M.; MEDEIROS, M. M.; COLHONE, M.; CIANCAGLINI, P.; BARBOZA, R.; MARINHO, C. R.; STÁBELI, R. G.; WUNDERLICH, G. Liposomes loaded with *P. falciparum* merozoite-derived proteins are highly immunogenic and produce invasion-inhibiting and anti-toxin antibodies. *Journal of Controlled Release*, v. 217, p. 121-127, 2015.

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. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in colombian malaria-naive volunteers by a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, 5 suppl, p. 3-9, 2005.

HERRERA, S.; FERNÁNDEZ, O. L.; VERA, O.; CÁRDENAS, W.; RAMÍREZ, O.; PALACIOS, R.; CHEN-MOK, M.; CORRADIN, G.; ARÉVALO-HERRERA, M. Phase I safety and immunogenicity trial of *Plasmodium vivax* CS derived long synthetic peptides adjuvanted with montanide ISA 720 or montanide ISA 51. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 84, n. 2 Suppl, p. 12-20, 2011.

HVIID, L.; BARFOD, L.; FOWKES, F. J. Trying to remember: immunological B cell memory to malaria. *Trends in Parasitology*, v. 31, n. 3, p. 89-94, 2015.

JAHNMATZ, M.; KESA, G.; NETTERLID, E.; BUISMAN, A. M.; THORSTENSSON, R.; AHLBORG, N. Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *Journal of immunological methods*, v. 391, n. (1-2), p. 50-59, 2013.

KINYANJUI, S. M.; BULL, P.; NEWBOLD, C. I.; MARSH, K. Kinetics of antibody responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte variant surface antigens. *The Journal of Infectious Disease*, v. 187, n. 4, p. 667-674, 2003.

KINYANJUI, S. M.; CONWAY, D. J.; LANAR, D. E.; MARSH, K. IgG antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. *Malaria journal*, v. 6, p. 82, 2007.

LANGHORNE, J.; NDUNGU, F. M.; SPONAAS, A. M.; MARSH, K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology*, v. 9, n. 7, p. 725-732, 2008.

- LIMA-JUNIOR, J. C.; TRAN, T. M.; MEYER, E. V. S.; SINGH, B.; DE-SIMONE, S. G.; SANTOS, F.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; MORENO, A.; BARNWELL, J.W.; GALINSKI, M. R.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals. *Vaccine*, v. 26, n. 51, p. 6645-6654, 2008.
- MALES, S.; GAYE, O.; GARCIA, A. Long-Term Asymptomatic Carriage of *Plasmodium falciparum* Protects from Malaria Attacks: a Prospective Study among Senegalese Children. *Clinical infectious diseases*, v. 46, n. 4, p. 516-522, 2008.
- MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanism in malaria. *Parasite Immunology*, v. 28, p. 51-60, 2006.
- MICHON, P.; FRASER, T.; ADAMS, J. H. Naturally Acquired and Vaccine-Elicited Antibodies Block Erythrocyte Cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein. *Infection and immunity*, v. 68, n. 6, p. 3164-3171, 2000.
- MIGOT, F.; MILLET, P.; CHOUGNET, C.; LEPERS, J. P.; DELORON, P. Humoral and cellular immune responses to the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in Madagascar. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 48, n. 4, p. 524-529, 1993.
- MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, v. 415, p. 673-679, 2002.
- MORAIS, C. G.; SOARES, I. S.; CARVALHO, L. H.; FONTES, C. J. F.; KRETTLI, A. U.; BRAGA, É. M. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. *Parasitology research*, v. 95, n. 6, p. 420-426, 2005.
- MORAIS, C. G.; SOARES, I. S.; CARVALHO, L. H.; FONTES, C. J.; KRETTLI, A. U.; BRAGA, E. M. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 75, n. 4, p. 582-587, 2006.
- MUELLER, I.; SHAKRI, A. R.; CHITNIS, C. E. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine*, v. 33, n. 52, p. 7489-7495, 2015.
- NAHRENDORF, W.; SCHOLZEN, A.; BIJKER, E. M.; TEIRLINCK, A. C.; BASTIAENS, G. J.; SCHATS, R.; HERMSEN, C. C.; VISSER, L. G.; LANGHORNE, J.; SAUERWEIN, R. W. Memory B-cell and antibody responses induced by *Plasmodium falciparum* sporozoite immunization. *Journal of Infectious Diseases*, v. 210, n. 12, p. 1981-1990, 2014.
- NDUNGU, F. M.; LUNDBLUM, K.; RONO, J.; ILLINGWORTH, J.; ERIKSSON, S.; FARNERT, A. Long-lived *Plasmodium falciparum* specific memory B cells in naturally exposed Swedish travelers. *European Journal of immunology*, v. 43, n. 11, p. 2919- 2929, 2013.
- NDUNGU, F. M.; OLOTU, A.; MWACHARO, J.; NYONDA, M.; APFELD, J.; MRAMBA, L. K.; FEGAN, G. W.; BEJON, P.; MARSH, K. Memory B cells are a more reliable archive for historical antimalarial responses than plasma antibodies in no-longer exposed children. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 21, p. 8247-8252, 2012.
- NOGARO, S. I.; HAFALLA, J. C.; WALTHER, B.; REMARQUE, E. J.; TETTEH, K. K. A.; CONWAY, D. J.; RILEY, E. M.; WALTHER, M. The Breadth, but Not the Magnitude, of Circulating Memory B Cell Responses to *P. falciparum* Increases with Age/Exposure in an Area of Low Transmission. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, e25582, 2011.
- NOGUEIRA, P. A.; ALVES, F. P.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; PEIN, O.; SANTOS, N. R.; DA SILVA, L. H. P.; CAMARGO, E.P.; DEL PORTILLO, H. A. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. *Infection and immunity*, v. 74, n. 5, p. 2726-2733, 2006.

POLLEY, S. D.; MWANGI, T.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; DUTTA, S.; LANAR, D. E.; REMARQUE, E.; ROSS, A.; WILLIAMS, T. N.; MWAMBINGU, G.; LOWE, B.; CONWAY, D. J.; MARSH, K. Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine*, v. 23, n. 5, p. 718-728, 2004.

REMARQUE, E.J.; FABER, B.W.; KOCKEN, C.H.; THOMAS, A.W. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitology*, v. 24, n. 2, p. 74-84, 2008.

RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; MARTINS-DA-SILVA, J. H.; SINGH, B.; JIANG, J.; MEYER, E. V.; SANTOS, F.; BANIC, D. M.; MORENO, A.; GALINSKI, M. R.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LIMA-JUNIOR, J. C. *In silico* Identification and Validation of a Linear and Naturally Immunogenic B-Cell Epitope of the *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate Merozoite Surface Protein-9. *PLoS One*, v. 11, n. 1, e0146951, 2016.

SÁNCHEZ-ARCILA, J. C.; DE FRANÇA, M. M.; PEREIRA, V. A.; VASCONCELOS M. P.; TÊVA, A.; PERCE-DA-SILVA, D. S.; NETO, J. R.; APRÍGIO, C. J.; LUGNIOR, J. C.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S.; BANIC, D. M.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. The influence of intestinal parasites on *Plasmodium vivax*-specific antibody responses to MSP-1₁₉ and AMA-1 in rural populations of the Brazilian Amazon. *Malaria journal*, v. 14, p. 442, 2015.

SCHOFIELD, L.; MUELLER, I. Clinical immunity to malaria. *Current molecular medicine*, v. 6, n. 2, p. 205-221, 2006.

SIQUEIRA, A. M.; LACERDA, M. V.; MAGALHÃES, B. M.; MOURÃO, M. P.; MELO, G. C.; ALEXANDRE, M. A.; ALECRIM, M. G. C.; KOCHAR, D.; KOCHAR, S.; KOCHAR, A.; NAYAK, K.; DEL PORTILHO, H.; GUINOVART, C.; ALONSO, P.; BASSAT, Q. Characterization of *Plasmodium vivax* - associated admissions to reference hospitals in Brazil and India. *BMC medicine*, v. 13, n. 1, p. 57, 2015.

STANISIC, D. I.; JAVATI, S.; KINIBORO, B.; LIN, E.; JIANG, J.; SINGH, B.; MEYER, E. V.; SIBA, P.; KOEPFLI, C.; FELGER, I.; GALINSKI, M. R.; MUELLER, I. Naturally acquired immune responses to *P. vivax* merozoite surface protein 3 α and merozoite surface protein 9 are associated with reduced risk of *P. vivax* malaria in young Papua New Guinean children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 11, e2498, 2013.

STRUICK, S. S.; RILEY, E. M. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunological Reviews*, v. 201: 268-290, 2004.

TAYLOR, R. R.; EGAN, A.; MCGUINNESS, D.; JEPSON A.; ADAIR, R.; DRAKELY, C.; RILEY, E. Selective recognition of malaria antigens by human serum antibodies is not genetically determined but demonstrates some features of clonal imprinting. *International Immunology*, v. 8, n. 6, p. 905-915, 1996.

WEISS, G. E.; TRAORE, B.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA, A.; DOUMBO, S.; DOUMTABE, D.; KONE, Y.; DIA, S.; GUINDO, A.; TRAORE, A.; HUANG, C. Y.; MIURA, K.; MIRCETIC, M.; LI, S.; BAUGHMAN, A.; NARUM, D. L.; MILLER, L. H.; DOUMBO, O. K.; PIERCE, S. K.; CROMPTON, P. D. The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 5, e1000912, 2010.

WIPASA, J.; SUPHAVILAI, C.; OKELL, L. C.; COOK, J.; CORRAN, P. H.; THAIKLA, K.; LIEWSAREE, W.; RILEY, E. M.; HAFALLA, J. C. Longlived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 2, e1000770, 2010.

WYKES, M. N.; ZHOU, Y. H.; LIU, X. Q.; GOOD, M. F. *Plasmodium yoelii* can ablate vaccine-induced long-term protection in mice. *The Journal of Immunology*, v. 175, n. 4, p. 2510-2516, 2005.

WYKES, M.; GOOD, M. F. Memory B cell responses and malaria. *Parasite Immunology*, v. 28, n. (1-2), p. 31-34, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), World Malaria Report 2015. Disponível em: <http://www.rbm.who.int/>. Acesso em: Maio/2016.

YILDIZ, Z. F.; PALACPAC, N.; YUKSEL, F.; YAGI, M.; HONJO, K.; FUJITA, Y.; ARISUE, N.; TAKEO, S.; TANABE, K.; HORII, T.; TSUBOI, T.; ISHII, K. J.; COBAN, C. Serologic markers in relation to parasite exposure history help to estimate transmission dynamics of *Plasmodium vivax*. *PLoS One*, v. 6, n. 11, e28126, 2011.

Parte 5.3 Perfil de células B de memória específicas para o Antígeno 1 de Membrana Apical de *Plasmodium vivax* (PvAMA-1) e cinética de subpopulações de células B em indivíduos da Amazônia Brasileira naturalmente expostos a *Plasmodium vivax*

5.3.1 Introdução

Imunidade adquirida naturalmente contra *P. falciparum* e *Plasmodium vivax*, principais espécies de plasmódios causadoras de malária humana, tem sido documentada em regiões com diferentes perfis epidemiológicos (RILEY et al., 1992; BAIRD, 1995; SOARES et al., 1999; BRAGA et al., 2002; HVIID, 2005; FRANÇA et al., 2016). Esses estudos demonstram que indivíduos continuamente expostos à doença desenvolvem diferentes graus de proteção, variando, desde uma reduzida morbidade, até a completa ausência de sintomas (MARSH, 1992; MARSH e KINYANJUI, 2006; LANGHORNE et al, 2008). Os mecanismos que mediam essa proteção não são completamente compreendidos, mas a participação de anticorpos, atuando contra estágios eritrocíticos dos parasitos, tem sido interpretada como fundamental no estabelecimento do equilíbrio parasito-hospedeiro (COHEN et al., 1961; SABCHAREON, et al., 1991; AKPOGHENETA et al., 2008; FOWKES et al., 2010). Assim, a maioria dos protótipos vacinais formulados nos últimos anos possui, como objetivo, a indução de imunidade humoral (revisito por RICHARDS e BEESON, 2009; ELLIS et al., 2010; OSIER et al., 2014).

Anticorpos comumente associados à imunidade antimalárica têm sido gerados especialmente contra antígenos que se localizam na superfície de merozoítos (*Merozoite Surface Protein - MSPs*) ou em organelas apicais. Nesse último caso encontra-se o Antígeno 1 de Membrana Apical (*Apical Membrane Antigen - AMA-1*). Essa proteína parece possuir papel crucial nos processos de ligação e/ou reorientação dos parasitos durante a invasão dos eritrócitos (MITCHELL et al., 2004), sendo, por isso, considerada uma importante candidata a compor uma vacina antimalárica de subunidades (HOLDER et al., 1994; GOOD, 2005; REMARQUE et al., 2008). Estudos *in vitro* apontaram que anticorpos anti-PfAMA-1 foram capazes de inibir a interação dos merozoítos com as hemácias, sugerindo o papel importante desta proteína nos processos de invasão dos parasitos aos eritrócitos (TRIGLIA et al., 2000; HODDER et al., 2001). *In vivo*, a relevância de AMA-1 na indução de imunidade tem sido demonstrada em estudos realizados em

modelos experimentais (ANDERS et al., 1998; STOWERS et al., 2002), bem como a partir de estudos focados em malária humana (POLLEY et al., 2004). Em modelo murino, observou-se que a vacinação com AMA-1 de *P. chabaudi* e *P. yoelii yoelii* induziu a geração de anticorpos específicos capazes de conferir proteção contra desafios futuros com formas sanguíneas dos parasitos. Da mesma forma, indivíduos residentes em áreas endêmicas para a doença apresentaram respostas proliferativas de células T e geração de anticorpos específicos para AMA-1 de *P. vivax* e *P. falciparum*, os quais foram associados à proteção contra a doença (UDHAYAKUMAR et al., 2001; POLLEY et al., 2004; RODRIGUES et al., 2005; MORAIS et al., 2006; WICKRAMARACHCHI et al., 2006; BARBEDO et al. 2007; MÚFALO et al., 2008; SETH et al., 2010; BUENO et al., 2011; DIAS et al., 2011; ZAKERI et al., 2013; SÁNCHEZ-ARCILA et al., 2015).

Apesar dos anticorpos estarem frequentemente associados à proteção anti-parasito ou anti-doença, ainda é intrigante os motivos pelos quais a imunidade induzida naturalmente não é esterilizante (revisto por WIPASA et al., 2002). A persistência dos parasitos, necessária para manter a estabilidade dos níveis de anticorpos específicos, tem sustentado a hipótese de que a infecção malárica induz a expansão defeituosa ou subótima de células B de memória (revisto por STRUIK e RILEY, 2004; revisto por LANGHORNE et al, 2008). Realmente, estudos conduzidos em pacientes infectados ou expostos a *P. falciparum* têm demonstrado perturbações no compartimento de células B, o que pode determinar efeitos negativos, sobretudo na geração/manutenção de MBCs (CROMPTON et al., 2009; TRAORE et al., 2009; PORTUGAL, PIERCE e CROMPTON, 2013, PORTUGAL et al, 2013; SCHOLZEN e SAUERWEIN, 2013; HVIID, BATFOD e FOWKES, 2015). Dentre estes efeitos estão, por exemplo, as baixas prevalências e a hiporresponsividade de MBCs a antígenos específicos (DORFMAN et al., 2005; WEISS et al., 2009; WIPASA et al., 2010; NOGARO et al., 2011; NDUNGU et al., 2012) e a expansão ou contração de determinados subtipos de células B implicadas às diferentes funções imunes (ASITO et al., 2008; WEISS et al., 2009; PORTUGAL et al., 2015; SULLIVAN et al., 2016).

Dentre os subtipos de MBCs que se apresentam expandidos durante a infecção malárica estão os denominados MBCs “atípicas” (WEISS et al., 2009; 2010; 2011; NOGARO et al., 2011; CLARK et al.; 2012; AYIEKO et al., 2013; ILLINGWORTH et al., 2013; NDUNGU et al., 2013; MUELLENBECK et al., 2013; AMPOMAH et al., 2014; REQUENA et al., 2014; SCHOLZEN et al., 2014;

PORTUGAL et al., 2015; SUBRAMANIAM et al., 2015; SULLIVAN et al., 2016). Essas células expressam receptores associados à redução da sinalização via BCR (particularmente FcRL5), comprometendo, desta maneira, suas funções efetoras tais como proliferação, produção citocinas e secreção de anticorpos, se comparadas às MBCs clássicas (HAGA et al., 2007; PORTUGAL et al., 2015, SULLIVAN et al., 2015). No entanto, até os dias atuais, a relação entre expansão de MBCs atípicas e o desenvolvimento/manutenção imunidade antimalárica permanece pouco elucidada (PORTUGAL et al., 2015; SULLIVAN et al., 2016). Infecções agudas induzidas por *P. falciparum* estão associadas à expansão de PCs, as quais são caracterizadas pela capacidade efetora de secretar prontamente anticorpos. O rápido retorno destas aos níveis fisiológicos após o tratamento da doença (CLARK et al., 2012; SULLIVAN et al., 2016), corrobora trabalhos conduzidos em modelos experimentais, que demonstraram que tais células circulam apenas durante curto período no sangue periférico de animais infectados em resposta ao estímulo antigênico recente (NDUATI et al., 2010). Por outro lado, declínio na frequência de MBCs clássicas no sangue periférico também foi observado em outros estudos (ASITO et al., 2008; SULLIVAN et al., 2016), sugerindo, por exemplo, que durante o episódio agudo da doença, as mesmas possam estar retidas em tecidos linfoides (CALLARD et al., 1982; DORFMAN et al., 2005) ou tenham se diferenciado em células secretoras de anticorpos (*Antibody Secreting Cells* - ASCs), exercendo, desta maneira, proteção contra a doença (CROMPTON et al., 2009).

Considerando-se que os estudos que avaliaram simultaneamente o perfil funcional e fenotípico de células B durante e após a malária vivax são escassos (e inexistentes no Brasil) e visto que PvAMA-1 é considerado um importante candidato vacinal, neste estudo foram investigadas as respostas de anticorpos e de MBCs específicas para PvAMA-1_{DII} durante a fase aguda e convalescença da malária vivax (30, 60 e 180 dias) em indivíduos residindo na Amazônia Brasileira. Além disso, o perfil fenotípico de diferentes subpopulações de MBCs também foi avaliado durante o seguimento dos indivíduos.

5.3.2 Resultados

5.3.2.1 Perfil de anticorpos anti-PvAMA-1_{DII} após a infecção por *P. vivax* sugere respostas de curta duração

As respostas de anticorpos direcionados à proteína recombinante de estágio sanguíneo PvAMA-1_{DII} foram investigadas nos mesmos grupos de indivíduos avaliados no capítulo 5.2. Desta maneira, as características demográficas e de exposição, bem como a densidade de parasitos circulantes (segundo relato de 0 e ≥ 1 episódios de malárias prévias), para esses indivíduos são as mesmas descritas na **Tabela 6** e **Figura 17**, respectivamente.

Como ilustrado na **Figura 24A**, a maior prevalência de respondedores para a proteína recombinante PvAMA-1_{DII} foi observada no grupo dos convalescentes de 30 dias (63%). Os demais grupos, incluindo os CE, apresentaram frequências similares de respondedores (prevalência média de 44%) (Teste do Qui-quadrado; $p < 0,01$).

Quanto à magnitude das respostas positivas específicas à PvAMA-1_{DII} (**Figura 24B**), foi observado níveis mais elevados de anticorpos circulantes (IR) em pacientes durante a fase aguda de malária vivax (IR = 3,9), sendo estes níveis mantidos por até 60 dias (IR = 2,4), (Teste de Kruskal-Wallis; $p > 0,05$). Interessantemente, apesar dos níveis médios de anticorpos anti-PvAMA-1_{DII} se mostrarem significativamente reduzidos em convalescentes de 180 dias em comparação em indivíduos avaliados na fase aguda e convalescentes de 30 dias, os mesmos são similares aos observados no grupo CE (IR = 1,4 e 1,5; respectivamente; Teste de Kruskal-Wallis; $p > 0,05$).

Quando o mesmo indivíduo teve sua amostra de soro avaliada na fase aguda da malária vivax e seis meses após o diagnóstico (conv 180d; $n = 16$) (**Figura 24C**), foi observada uma tendência à redução da magnitude da resposta de anticorpos específicos (agudo = 2,4 *versus* conv 180d = 0,9) (Teste pareado de Wilcoxon; $p > 0,05$). Somente 50% (4/8) dos indivíduos positivos na fase aguda permaneceram positivos para anticorpos anti-PvAMA-1_{DII} após 180 dias decorridos da infecção. Porém, cerca de 38% (3/8) dos negativos na fase aguda foram positivos 180 dias após a infecção.

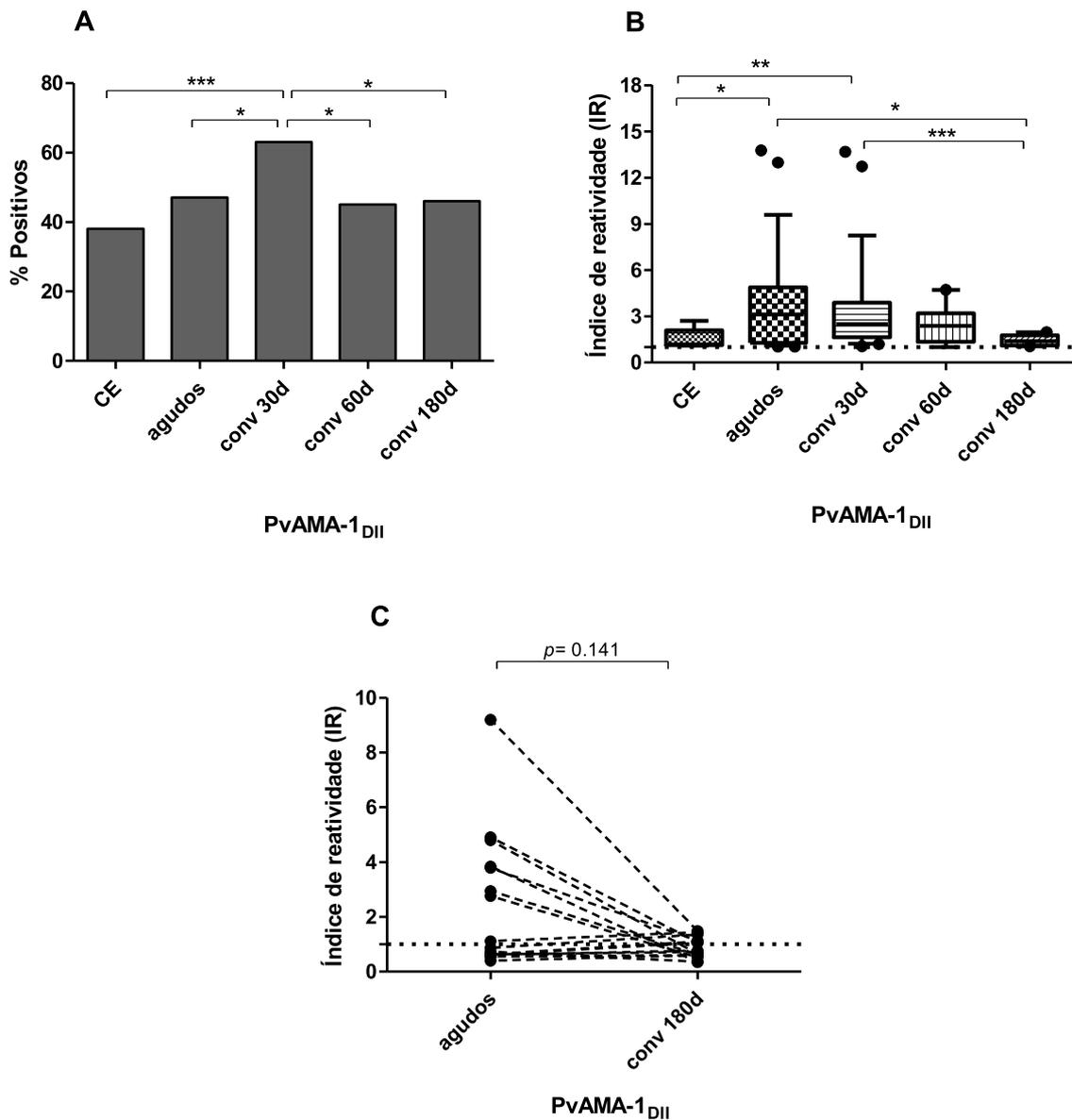


Figura 24. Imunogenicidade de PvAMA-1_{DII} durante o curso da infecção por *P. vivax*. Frequência de respondedores. As barras indicam a proporção de amostras respondedoras positivas no respectivo tempo avaliado (A). Índice de reatividade de indivíduos respondedores positivos ao longo da infecção ocasionada por *P. vivax*. Whiskers indicam os 10th ao 90th percentis e outliers são indicados pelos dots abaixo e acima dos boxes. A linha horizontal dentro dos boxes representam as medianas (B). Cada amostra de plasma foi testada em duplicata pelo ELISA. A significância estatística entre diferentes pontos foi avaliada pelo teste do Qui-quadrado (com teste de Fisher para comparações múltiplas) para (A) e teste de Kruskal-Wallis (com teste de Mann Whitney para comparações múltiplas) para (B). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. CE (Controles expostos, $n = 21$), pacientes com infecção aguda (agudos, $n = 57$), após tratamento (convalescentes “conv 30d”, “conv 60d” e “conv 180d” após o diagnóstico, $n = 41$, 20 e 27, respectivamente). Mudanças temporais no índice de reatividade (IR) de IgGs específicas a PvAMA1_{DII} no plasma dos indivíduos durante o seguimento (agudos e conv 180d, $n = 16$) (C). Cada linha pontilhada conectando os diferentes pontos representa um indivíduo. Cada amostra de plasma foi testada em duplicata por ELISA. A significância estatística entre os vários grupos foi determinada pelo teste pareado de Wilcoxon (C).

Durante o episódio agudo de malária vivax, também foi investigada a influência de infecções pregressas no perfil de respondedores e níveis de anticorpos anti-PvAMA-1_{DII}. Para tal, os indivíduos pertencentes a esse grupo foram divididos em primoinfectados (n = 21) e indivíduos relatando uma ou mais malárias prévias (n = 36) (**Figura 25**). Foi observado que a frequência de indivíduos agudos que apresentaram anticorpos circulantes direcionados à PvAMA-1_{DII} foi maior dentre os pacientes relatando infecção prévia, se comparado aos que relatam estar sofrendo o primeiro episódio de malária no momento deste estudo (56% *versus* 38%) (Teste de Fisher; $p < 0,05$) (**Figura 25A**). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de anticorpos PvAMA-1_{DII} específicos quando indivíduos primoinfectados e relatando episódios pregressos da doença foram comparados (IR = 2,5 e 4,5, respectivamente) (Teste de Mann-Whitney; $p > 0,05$) (**Figura 25B**).

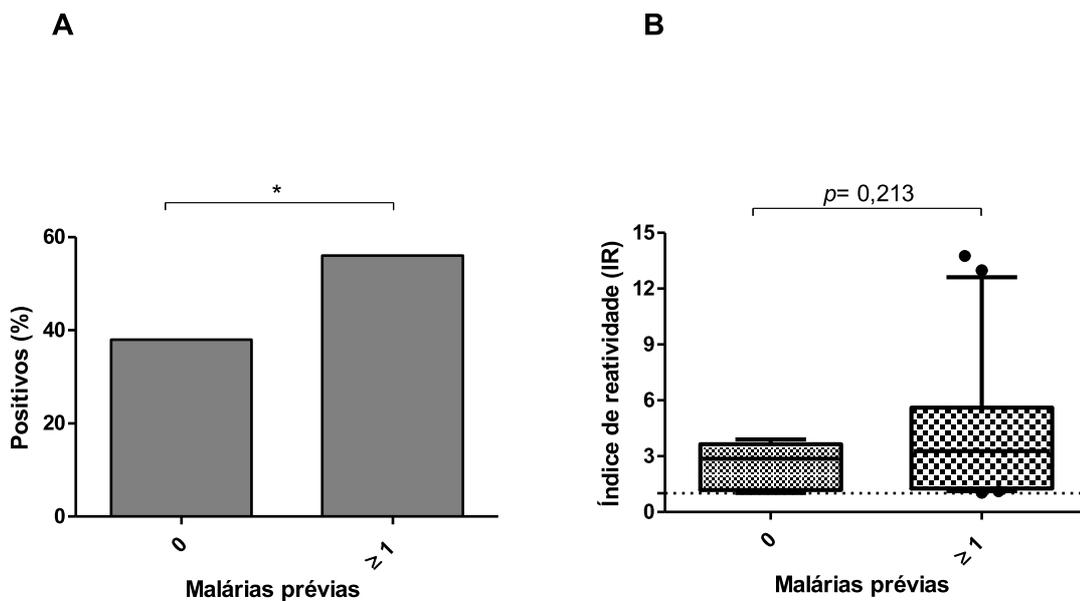


Figura 25. Associação entre frequência de indivíduos respondedores e níveis de anticorpos específicos à proteína recombinante PvAMA-1_{DII} e existência de episódios prévios de malária. Indivíduos durante a fase aguda de malária vivax (n = 57) foram agrupados de acordo com a ocorrência de episódios pregressos de malária. O número de indivíduos que compõem cada grupo foram de 21 para primoinfectados e 36 para previamente infectados. Barras indicam a proporção de indivíduos respondedores positivos à proteína PvAMA-1_{DII} (A). Índice de reatividade dos indivíduos respondedores positivos durante a infecção aguda de malária vivax de acordo com a ocorrência de malária prévia declarada (B). A significância estatística entre os diferentes grupos foram avaliados pelo teste de Fisher para (A) e teste de Mann-Whitney para (B). * $p < 0,05$.

5.3.2.2 Indivíduos expostos na Amazônia Brasileira exibem MBCs específicas para PvAMA-1_{DII}, as quais persistem por longos períodos

Em seguida, foi explorado se 1) foram geradas células B de memória (MBCs) PvAMA-1_{DII} específicas nos indivíduos avaliados; 2) se elas estiverem presentes, como foi a magnitude de resposta de MBCs específicas em cada grupo e 3) como estas células se comportaram após a malária aguda patente, durante o período de 6 meses de seguimento.

Considerando que o número de ASCs detectadas na cultura *in vitro* seja um reflexo da frequência precursora de MBCs circulantes, foi observado MBCs PvAMA-1_{DII} específicas em todos os grupos analisados (**Figura 26**). O percentual de indivíduos que apresentaram MBCs anti-PvAMA-1_{DII} específicas foram de 67%, 45%, 62% e 56% para os grupos CE, agudos, e convalescentes de 60 e de 180 dias, respectivamente. As magnitudes das respostas não foram estatisticamente distintas entre os grupos, independente se os resultados foram reportados como número de spots PvAMA-1_{DII} específicos por 10⁶ PBMCs (variando de 1 à 82 ASC/10⁶ células) (Teste de Kruskal-Wallis; $p > 0,05$) (**Figura 26A**) ou proporção de ASCs secretoras de IgG totais PvAMA-1_{DII} específicas (% ASC específicas variando de 0,01 à 3,2) (Teste de Kruskal-Wallis; $p > 0,05$) (**Figura 26B**).

No intuito de se avaliar se o tempo decorrido após a infecção poderia ser um fator determinante na frequência de MBCs PvAMA-1_{DII} específicas, foram selecionados para essa análise indivíduos cujas PBMCs foram coletadas durante a malária aguda e 180 dias após o tratamento ($n = 14$) (**Figura 26C**). Não foram observadas alterações significativas na proporção de indivíduos contendo MBCs PvAMA-1_{DII} específicas durante a fase aguda de malária vivax e após 6 meses do diagnóstico (43% e 50%, respectivamente) (Teste de Fisher; $p > 0,05$). Do mesmo modo, não houve mudanças significativas na magnitude de resposta destas MBCs entre estes pontos avaliados, embora tenha sido observada a tendência à percentuais elevados destas células em convalescentes de 180d (% PvAMA-1_{DII} - MBC: 0,05% vs. 0,13%, respectivamente) (Teste pareado de Wilcoxon; $p > 0,05$).

As alterações mais evidentes nestes resultados foram notadas quando os participantes foram avaliados individualmente. Nesse sentido, foi observado que 63% (5/8) dos indivíduos que eram negativos para MBCs específicas durante a fase aguda de malária, tornaram-se positivos durante a fase de convalescença. Por outro lado, 67% (4/6) dos indivíduos que inicialmente eram positivos para MBCs-específicas, tornaram-se negativos seis meses após o diagnóstico de malária vivax (**Figura 26C**). Imagens representativas de respostas inespecíficas (meio + SFB

10%), ASCs secretoras de IgG totais e ASCs secretoras de IgG AMA-1_{DII} específicas são exibidas na **Figura 26D**.

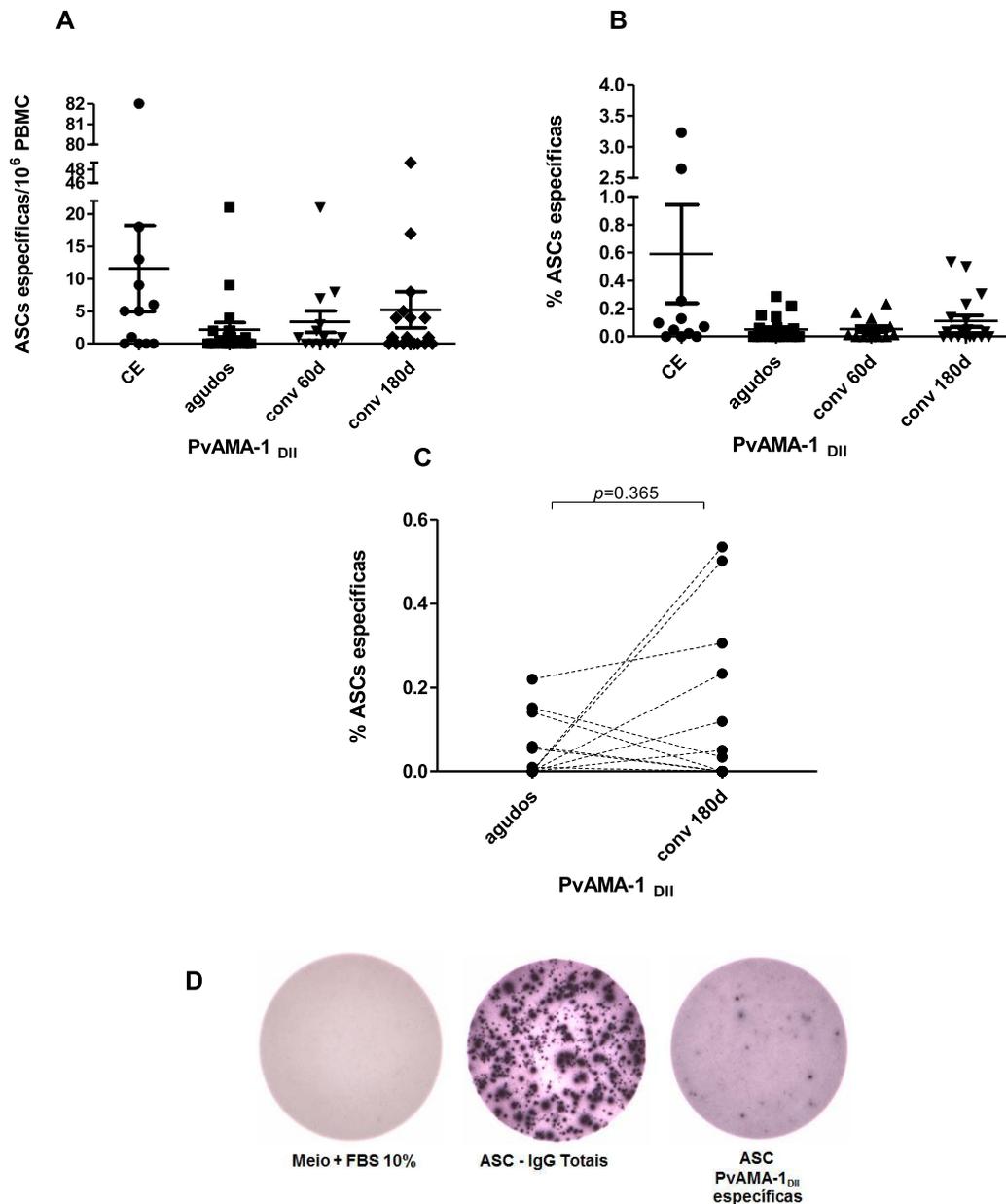


Figura 26. Resposta naturalmente adquirida de MBCs à proteína recombinante PvAMA-1_{DII} ao longo do curso da infecção por *P. vivax*. Resposta antígeno específica dos indivíduos observada pelo ELISpot expressas como ASCs antígeno específicas/10⁶ PBMCs (A) e percentual (%) de ASCs específicas secretoras de IgG (B). Cada ponto representa uma amostra de PBMCs que foi testada em duplicata por ELISpot. A média de cada grupo foi indicada pela linha horizontal \pm S.E.M. Significância estatística entre diferentes pontos avaliados foi determinada para cada antígeno através do teste de Kruskal-Wallis (com teste de Mann Whitney para comparações múltiplas; $p > 0,05$). CE (Controles expostos, $n = 12$), agudos ($n = 20$); pós-infecção (convalescentes “60d” e “180d” após o diagnóstico, $n = 13$ e 18, respectivamente). Mudanças temporais nas frequências de MBCs PvAMA-1_{DII} específicas (C) em PBMCs dos indivíduos durante o seguimento (agudos e conv 180d, $n = 14$). Cada linha pontilhada conectando diferentes pontos representa um participante individual. Cada amostra de PBMCs foi testada em duplicata por ELISpot. A significância estatística entre os vários grupos foi determinada pelo teste pareado de Wilcoxon. Imagens representativas dos experimentos (Meio + FBS 10%); ASCs secretoras de IgG totais; ASCs secretoras de IgG PvAMA-1_{DII} específicas (D).

A heterogeneidade individual nos padrões das respostas de anticorpos e de MBCs é representada na tabela disponível no **ANEXO F**. Apesar de 85% dos indivíduos apresentarem anticorpos e/ou MBCs PvAMA-1_{DII} específicos, MBCs estiveram ausentes (por exemplo, nos indivíduos 3, 4 e 22). Do mesmo modo, em alguns indivíduos onde os anticorpos não foram detectáveis, MBCs específicas foram observadas através do ELISpot (por exemplo, nos indivíduos 1, 8, 10, 11, 13, 15 e 17).

5.3.2.3 Perfil das subpopulações de células B em indivíduos da Amazônia Brasileira naturalmente expostos a *Plasmodium vivax*

Diversos estudos têm relatado frequências aumentadas de MBCs atípicas em indivíduos expostos a *P. falciparum* (WEISS et al., 2009; 2010; 2011; NOGARO et al., 2011; CLARK et al., 2012; AYIEKO et al., 2013; ILLINGWORTH et al., 2013; NDUNGU et al., 2013; MUELLENBECK et al., 2013; AMPOMAH et al., 2014; REQUENA et al., 2014; SCHOLZEN et al., 2014; PORTUGAL et al., 2015; SUBRAMANIAM et al., 2015; SULLIVAN et al., 2016), assim como alterações em outros subtipos de células B tais como imaturas, naives, MBCs clássicas, ativadas e PCs (ASITO et al., 2008; 2011; WEISS et al., 2009; 2011; CLARK et al., 2012; AYIEKO et al., 2013; ILLINGWORTH et al., 2013; AMPOMAH et al., 2014; SULLIVAN et al., 2016). Assim, sugere-se que tais alterações possam estar relacionadas às disfunções na aquisição e manutenção de imunidade protetora à malária falciparum (WEISS et al., 2009; SCHOLZEN e SAUERWEIN, 2013; PORTUGAL, PIERCE e CROMPTON, 2013; PORTUGAL et al., 2015; SULLIVAN et al., 2016).

Nesse estudo, foi investigado se a exposição à malária em áreas de baixa transmissão como verificada na Amazônia Brasileira poderia estar associada às alterações no compartimento de linfócitos B também durante a malária vivax. Foram então determinadas as frequências de distintos subtipos de células CD19⁺ em todos os indivíduos dos quais tínhamos células disponíveis para esta análise fenotípica, sendo: agudos: n = 19; convalescentes 30, 60 e 180 dias após o diagnóstico: n = 19, 14 e 16, respectivamente. Os resultados obtidos foram comparados com os dados provenientes de indivíduos expostos, porém não infectados (CE: n = 15). Também foi avaliada a influência da exposição em áreas endêmicas de malária no

compartimento de células B (controles não expostos - CNE; n = 5). A estratégia de análise utilizada foi exibida na **Figura 9**, disponível em **Material e métodos**.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as frequências de células T (CD3⁺), B totais (CD19⁺), B naives (CD19⁺CD10⁻CD21⁺CD27⁻) e MBCs ativadas (CD19⁺CD10⁻CD21⁻CD27⁺CD20⁺) entre os grupos estudados (Teste de Kruskal-Wallis; $p > 0,05$) (**Figuras 27A, B, D e G**). No entanto, variações significativas foram detectadas em outros subtipos de células B analisados.

Pacientes com malária vivax patente apresentaram frequências elevadas de linfócitos B imaturos (CD19⁺CD10⁺) (4,6%) (**Figura 27C**). Porém, estas frequências foram normalizadas gradualmente durante o período de convalescença (3,1%, 2,6% e 2,4%, para conv 30, 60 e 180d, respectivamente), retornando aos níveis semelhantes aos exibidos pelos grupos controles (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$).

Para MBCs clássicas (CD19⁺CD10⁻CD21⁺CD27⁺) (**Figura 27E**), foram observadas frequências aumentadas deste subtipo de linfócitos B em controles expostos (CE) (29,4%) em relação aos pacientes infectados por *P. vivax* (17,7%) e convalescentes (16,2%, 18,3% e 19,1%, para conv 30, 60 e 180d, respectivamente) (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$). Interessantemente, foi observado que CNE e CE apresentaram proporções similares deste subtipo celular (26% e 29,4%, respectivamente).

Com relação às MBCs atípicas (CD19⁺CD10⁻CD21⁻CD27⁻) (**Figura 27F**), foi observado que as mesmas encontram-se expandidas em indivíduos residentes em regiões endêmicas da doença (CE), se comparados aos indivíduos não expostos (10,9% vs. 4,7%, respectivamente) (Teste de Mann-Whitney; $p < 0,05$). Esta expansão esteve presente independentemente dos indivíduos estarem na fase aguda da infecção ou convalescença (Teste de Kruskal-Wallis; $p > 0,05$).

Finalmente, foi observado um aumento significativo na frequência de PCs (CD19⁺CD10⁻CD21⁻CD27⁺CD20⁻) em pacientes durante o episódio de malária vivax, se comparados aos demais percentuais exibidos por todos os demais grupos estudados (**Figura 27H**). A expansão destas células, presente apenas durante a fase aguda da infecção (3,9%), foi revertida na convalescência, onde foi observada a contração desta subpopulação de células B (1,3%, 1,3% e 1,2%, para conv 30, 60 e 180d, respectivamente) (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$).

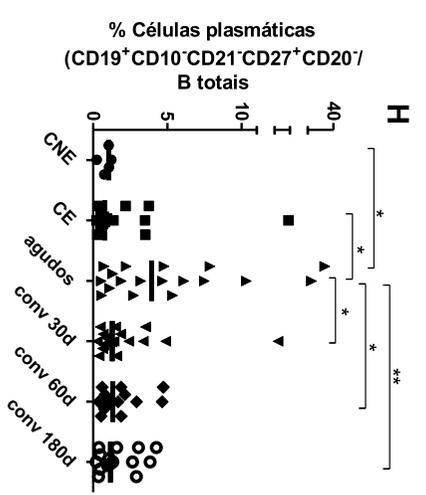
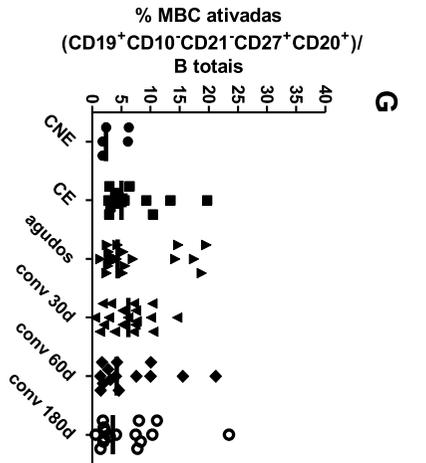
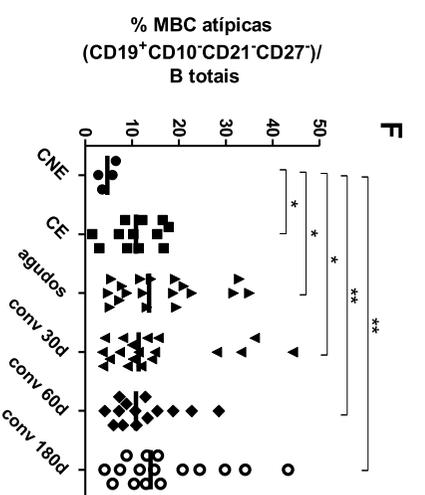
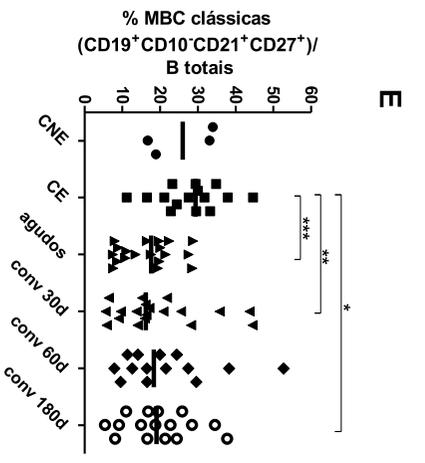
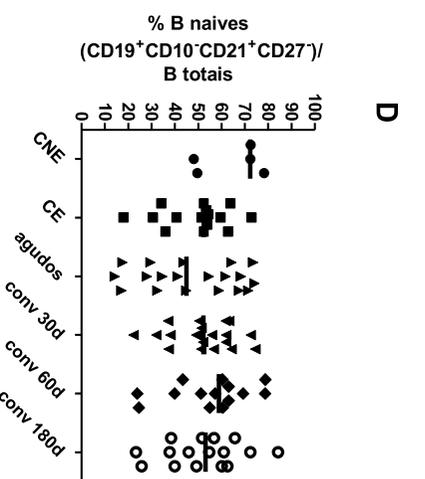
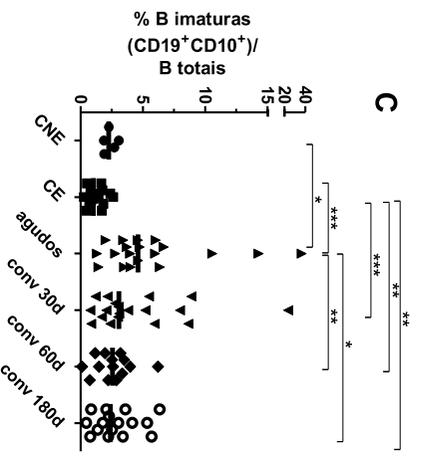
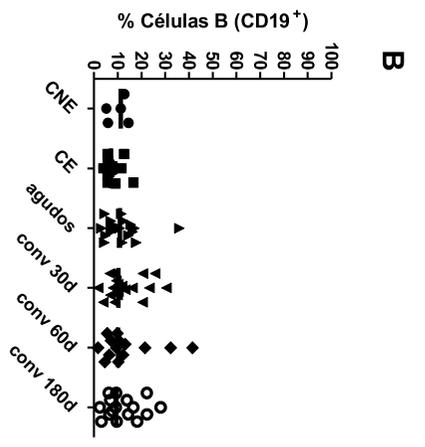
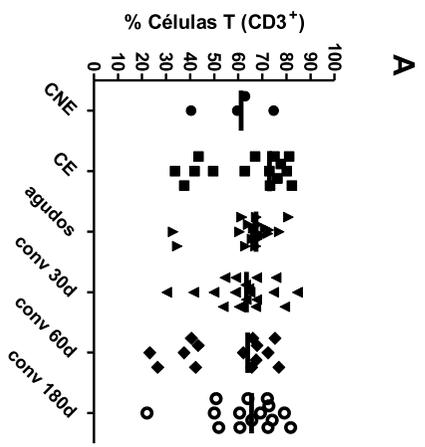


Figura 27. Distribuição dos subtipos de células B em indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira. Gráficos de C-H são diferentes subtipos de células B. Cada ponto representa uma amostra que foi testada por citometria de fluxo. A mediana de cada grupo foi representada por uma linha horizontal. Controles não expostos (CNE) (n = 5), controles expostos (CE) (n = 15), agudos (n = 19); pós-infecção (convalescentes 30, 60 e 180 dias após o diagnóstico, n = 19, n = 14 e 16, respectivamente). As significâncias estatísticas entre diferentes pontos foram determinadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis (com teste de Mann Whitney para comparações múltiplas); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A **Figura 28** representa o perfil geral dos subtipos de células B avaliados nos grupos estudados.

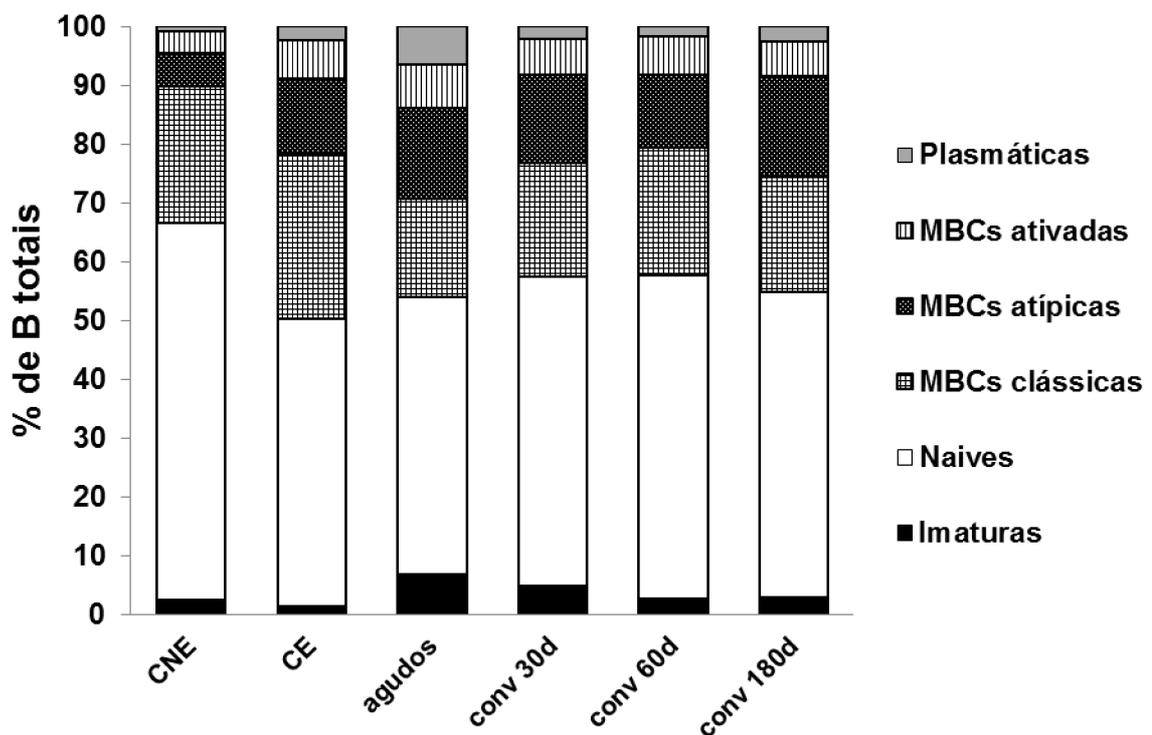


Figura 28. Perfil representativo dos subtipos de células B em indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira. As frequências dos subtipos de células B foram determinadas por citometria de fluxo, conforme previamente detalhado. Controles não expostos (CNE) (n = 5), controles expostos (CE) (n = 15), agudos (n = 19); pós-infecção (convalescentes 30, 60 e 180 dias após o diagnóstico, n = 19, n = 14 e 16, respectivamente). As proporções relativas das subpopulações de células B foram analisadas em relação às células B totais (CD19⁺) e exibidas nos quadrados empilhados.

Visto que células B atípicas estiveram expandidas na fase aguda e de convalescença da infecção, foi investigada a influência de infecções prévias neste cenário (**Figura 29**). Os resultados demonstraram que a frequência de células B atípicas observada em indivíduos expostos com relato de episódios progressivos de malária foi significativamente superior à observada em indivíduos expostos, porém,

sem relato de malária (17,3% versus 9,4%, respectivamente; Teste de Mann Whitney; $p < 0,05$).

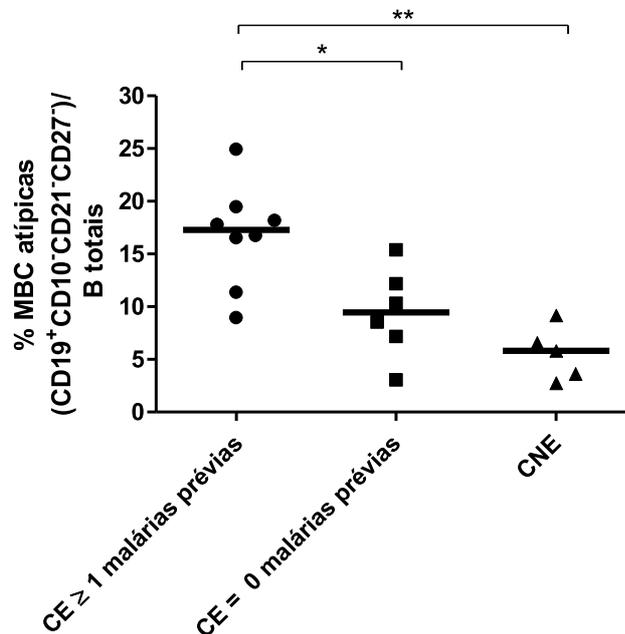


Figura 29. Indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira naturalmente expostos aos parasitos também exibiram expansão de MBCs atípicas em seu sangue periférico. Influência da exposição e episódios progressivos de malária na expansão de MBCs atípicas. Cada ponto representa uma amostra testada por citometria de fluxo. A mediana referente a cada grupo foi indicada pela linha horizontal. Controles não expostos (CNE) ($n = 5$) e controles expostos (CE) ($n = 15$). As significâncias estatísticas entre diferentes pontos foram determinadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis (com teste de Mann Whitney para comparações múltiplas); $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

A seguir, também foi determinada a razão entre MBCs clássicas e atípicas. Interessantemente, para indivíduos não expostos, a razão MBCs clássicas/atípicas foi cerca de 5; para controles expostos (CE) foi de 3 e para pacientes com infecção aguda por *P. vivax* e convalescentes esta razão foi cerca de 1 (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,05$). Estes valores enfatizam a importância de se investigar melhor o impacto da expansão de MBCs atípicas na aquisição de imunidade a *P. vivax* em indivíduos provenientes da Amazônia Brasileira.

5.3.2.4 Análise longitudinal de subpopulações de B nos distintos pontos do seguimento confirma a expansão de células B imaturas e PCs durante a fase aguda de malária vivax

Com a finalidade de verificar se as observações feitas para a população geral de indivíduos em relação às oscilações no perfil fenotípico de células B podem ser

confirmadas em âmbito individual, foi realizada a análise pareada de 9 indivíduos cujas amostras de PBMCs estavam disponíveis para todos os pontos do seguimento (**Figura 30**). Pelos gráficos foi possível confirmar a expansão previamente observada em células B imaturas (4,6% vs. 2,2%, 2,0% e 2,3%, para malária vivax aguda, conv 30, 60 e 180d, respectivamente) (Teste de Friedman; $p < 0,01$) (**Figura 30A**) e PCs (4,8% vs. 1,9%, 1,0% e 2,2%, para malária vivax aguda, conv 30, 60 e 180d, respectivamente) (Teste de Friedman; $p < 0,05$) (**Figura 30F**) durante a infecção plasmodial. Durante a convalescença, as frequências de ambos os subtipos de células B retornaram aos níveis fisiológicos. Para as células B naives, MBCs clássicas, atípicas e ativadas não foram observadas diferenças entre os pontos analisados (Teste de Friedman; $p > 0,05$) (**Figuras 30B - E**).

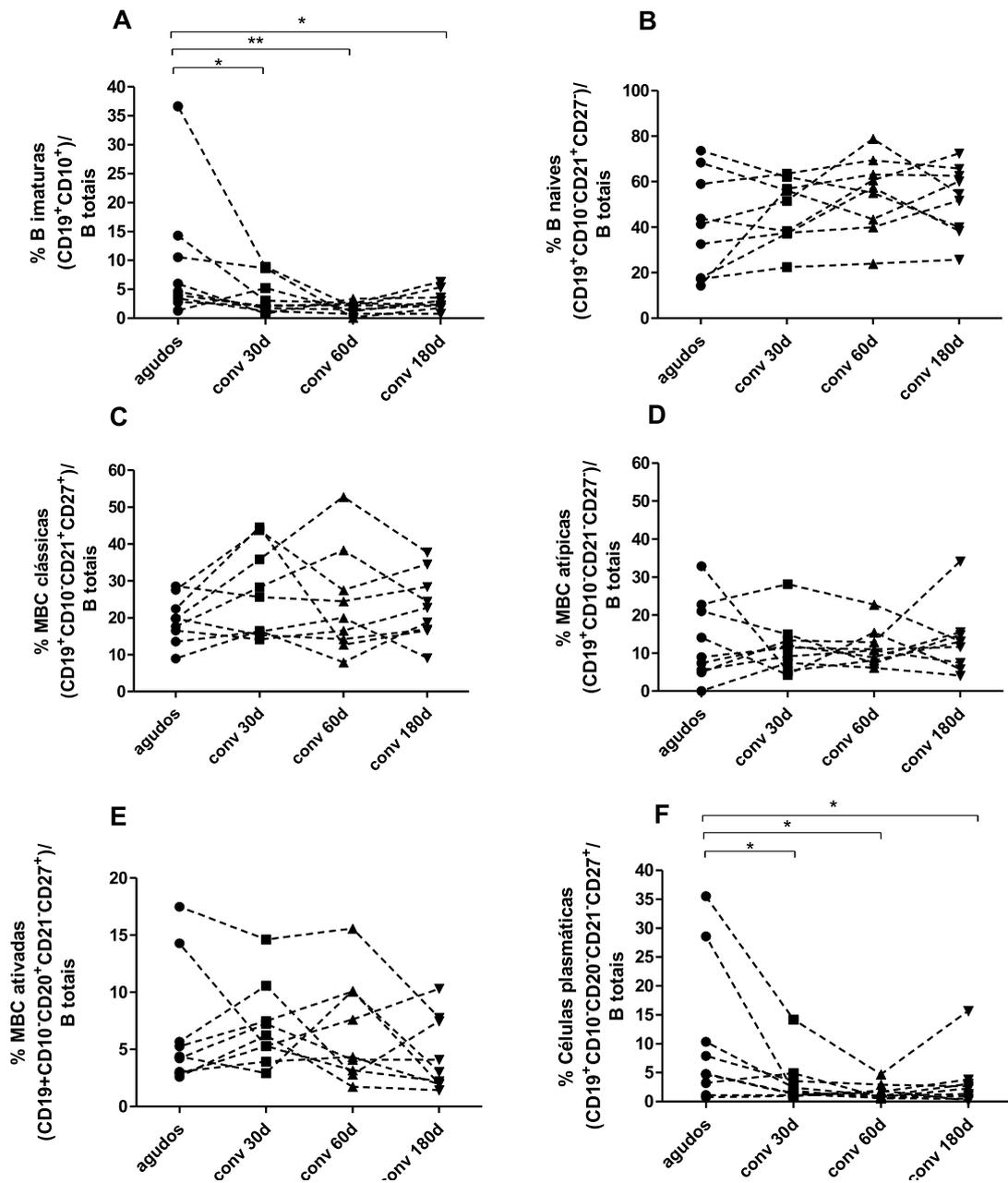


Figura 30. Alterações induzidas pelo decorrer do tempo nos subtipos de linfócitos B durante os seis meses de seguimento. Gráficos de A-F representam distintos subtipos de células B conforme determinados pela citometria de fluxo e as frequências relativas a cada subtipo são exibidas nos gráficos. Cada linha pontilhada conectando diferentes pontos representa um participante individual ($n = 9$). A significância estatística entre os vários grupos foi determinada pelo teste de Friedman (com teste de Wilcoxon para comparações múltiplas); $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

5.3.3 Discussão

Considerando a imunogenicidade de PvAMA-1 observada em diversos trabalhos prévios (RODRIGUES et al., 2005; MORAIS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; BARBEDO et al., 2007; REMARQUE et al., 2008; MÚFALO et al., 2008;

BUENO et al., 2011; SÁNCHEZ-ARCILA et al., 2015), nesse estudo foi avaliada a relação entre o perfil de resposta de anticorpos direcionados a essa proteína (DII) e a geração e manutenção de células B de memória (MBCs) durante e após o tratamento de indivíduos residentes na Amazônia Brasileira relatando malária vivax.

Os dados sorológicos obtidos permitiram observar que todos os grupos apresentaram considerável prevalência de respondedores contra a proteína PvAMA-1_{DII}, com destaque para convalescentes de 30d (63%) (**Figura 24A**). Dentre os indivíduos que reportaram anticorpos anti-PvAMA-1_{DII}, foi observado que aqueles situados na convalescença de 180 dias apresentaram níveis significativamente reduzidos de IgG, se comparados a indivíduos agudos ou convalescentes de 30 dias (**Figura 24B**). A tendência na redução dos níveis de IgG anti-PvAMA-1_{DII} foi observada ainda quando amostras de soro de um mesmo indivíduo foram avaliadas durante o episódio agudo da doença e 180 dias após o tratamento (**Figura 24C**). Esses dados sugerem que anticorpos anti-PvAMA-1_{DII} podem não ser mantidos na circulação em altos níveis seguindo-se o tratamento da doença. Os resultados exibidos são distintos dos observados no capítulo 5.2 deste estudo, onde anticorpos direcionados aos peptídeos que representam PvAMA-1 e PvMSP-9 se mostraram mais estáveis com o passar do tempo.

Na tentativa de avaliar a influência de infecções pregressas de malária na frequência de respondedores e níveis de anticorpos circulantes, indivíduos na fase aguda de malária vivax (relatando os maiores IR) foram estratificados em: zero episódios pregressos de malária e ≥ 1 episódios (**Figura 25**). Foi observada uma maior prevalência de respondedores entre indivíduos que relataram ocorrência de ≥ 1 malárias prévias, porém, os níveis de anticorpos específicos não foram significativamente diferentes entre primoinfectados e aqueles que relataram ≥ 1 malárias prévias. Quanto à relação entre frequência de respondedores e episódios pregressos de malária, os resultados obtidos nesse estudo corroboram dados da literatura que mostram que episódios pregressos de malária estão associados ao aumento da prevalência de respondedores à PvAMA-1 (RODRIGUES et al., 2005; BARBEDO et al., 2007). Por outro lado, Rodrigues e colaboradores (2005) observaram níveis reduzidos destes anticorpos em primoinfectados, se comparados aos de indivíduos que relataram episódios prévios de malária (RODRIGUES et al., 2005). Tendo em vista a nítida tendência de elevação nos níveis de anticorpos em

indivíduos reportando malárias prévias, tornam-se necessários outros estudos onde maior número de indivíduos possa ser avaliado.

Após a determinação da resposta de IgG total anti-PvAMA-1_{DII}, foram avaliadas a prevalência, magnitude e persistência de MBCs específicas frente à essa proteína. Dentre os grupos avaliados, os percentuais de indivíduos apresentando MBCs específicas, bem como a magnitude de resposta para essas células foram similares (**Figura 26B**). Além disso, a análise pareada de amostras de PBMCs coletadas a partir de um mesmo indivíduo (fase aguda e convalescença) permitiu verificar que o percentual de indivíduos que apresentaram MBCs anti-PvAMA-1_{DII} se manteve estável por até 6 meses após o diagnóstico/tratamento da doença (43% dos indivíduos apresentaram MBCs específicas na fase aguda e 50% na fase de convalescença de 180 dias). Apesar de variações individuais na frequência de MBCs terem sido observadas (**Figura 26C**), dados oriundos da análise de CE sugerem que, quando geradas, as MBCs e anticorpos antimaláricos são capazes de persistir durante longos períodos. Neste sentido, podemos citar, por exemplo, dois indivíduos controles expostos (6CE e 10CE) que, mesmo tendo sofrido o último episódio agudo da doença há mais de 10 anos apresentaram MBCs capazes de responder a PvAMA-1_{DII}, bem como níveis positivos de anticorpos anti-PvAMA-1_{DII}.

Os dados exibidos neste estudo mostraram-se de acordo com os disponíveis na literatura, que relatam que MBCs direcionadas aos antígenos de *Plasmodium falciparum*, especialmente, podem ser geradas e ter longa vida em indivíduos expostos. Nesses estudos, a prevalência de indivíduos apresentando MBCs antígeno-específicas foi de 30 a 50%, mesmo após décadas de exposição à malária (WEISS et al., 2010; 2012; DORFMAN et al., 2005; NDUNGU et al., 2012; NOGARO et al., 2011; WIPASA et al., 2010). Relativo à malária vivax, não existe dados disponíveis sobre a ocorrência de MBCs específicas durante o episódio agudo da doença, o que torna nossos resultados de grande relevância. O único estudo direcionado a *P. vivax* é de Wipasa e colaboradores (2010), que avaliaram concomitantemente a resposta de anticorpos e MBCs específicas a PvAMA-1 (ectodomínio completo), PvMSP-1₁₉ e PvDBP em indivíduos relatando episódios pregressos de malária falciparum e/ou vivax, porém, sem infecção ativa. Apesar dos dados serem interessantes, visto que os autores demonstram que, em condições de transmissão esporádica da doença, indivíduos adultos se apresentaram

soropositivos para os antígenos de *P. vivax* no momento do recrutamento, permanecendo positivos ao longo do estudo (12 meses), a ausência de dados originados a partir da fase aguda de malária traz limitações à interpretação dos resultados. Nesse estudo, mesmo sem qualquer evidência de resposta de anticorpo e MBCs durante a fase aguda da doença, os autores concluíram que os níveis de anticorpos e magnitude de MBCs específicas aos antígenos plasmodiais são estáveis com o decorrer do tempo (WIPASA et al., 2010).

No que diz respeito às falhas na manutenção de imunidade induzida por meio de imunizações, é hipotetizado que uma série de fatores, tal como, modulação no compartimento de células B em decorrência da exposição a distintos antígenos plasmodiais (PORTUGAL, PIERCE e CROMPTON, 2013; PORTUGAL et al., 2013; SCHOLZEN e SAUERWEIN, 2013; HVIID, BATFOD e FOWKES, 2015), podem estar associados a esse processo. No presente estudo, foi observada expansão de células B imaturas e PCs durante a malária aguda, seguindo-se contração das mesmas aos níveis fisiológicos após o tratamento da infecção plasmodial. No entanto, trabalhos disponíveis na literatura apontam que a expansão de B imaturas não se estendeu aos adultos naturalmente infectados por *P. falciparum*, mas apenas em crianças (ASITO et al., 2008; 2011; WEISS et al., 2009; PORTUGAL et al., 2012). Os fatores que direcionam estes achados não são comprovados até o momento e parecem ser ligados à idade (SCHOLZEN e SAUERWEIN, 2013). Dentre os fatores associados à expansão de células B imaturas, sugere-se uma reação fisiológica em resposta à linfopenia característica da fase aguda da doença (HVIID e KEMP, 2000; MALASPINA et al., 2007) e à saída precoce destas células da medula óssea, como previamente demonstrada em modelos experimentais (BOCKSTAL et al., 2011). Em relação à expansão de PCs durante a malária aguda, isso já foi observado em outros estudos (CLARK et al., 2012; SULLIVAN et al., 2016). Devido ao fato de PCs responderem rapidamente aos estímulos antigênicos específicos, Sullivan e colaboradores (2016) sugeriram que o momento em que o indivíduo apresenta-se com os sintomas de malária e ainda não recebeu o tratamento quimioterápico deva ser o momento ideal para caracterizar plasmablastos/PCs no sangue periférico (SULLIVAN et al., 2016).

Neste estudo também foram observadas frequências aumentadas de MBCs clássicas em indivíduos expostos, porém não infectados, se comparados aos indivíduos durante a fase aguda de malária vivax, bem como em convalescentes.

Apesar disso, foi observada uma tendência à elevação das frequências de MBCs clássicas durante a convalescença da doença. Outros estudos disponíveis na literatura também relataram ligeira queda em MBCs clássicas durante episódios agudos de malária falciparum (revisto por AMEZCUA-VESELY et al., 2012; BORHIS e RICHARDS, 2015), sendo observadas inclusive frequências estáveis das mesmas em crianças de Uganda ao longo de um período de observação de 28 dias após o início do tratamento de malária falciparum (SULLIVAN et al., 2016). Na tentativa de explicar tais observações, foi hipotetizado que infecções maláricas agudas ou recentes podem ocasionar retenção de MBCs clássicas em tecidos linfoides (CALLARD et al., 1982; DORFMAN et al., 2005). Além disso, é possível que durante a fase aguda, MBCs clássicas se diferenciem em ASCs tendo, portanto, sua frequência reduzida na periferia (CROMPTON et al., 2009).

Interessantemente, níveis de MBCs atípicas estiveram elevados em todos os grupos de indivíduos avaliados. Do mesmo modo, Illingworth e colaboradores (2013) também observaram que crianças africanas infectadas por *P. falciparum* em áreas de transmissão estável para a doença ou apenas expostas, mas não infectadas, apresentaram frequências elevadas e similares de MBCs atípicas (ILLINGWORTH et al.; 2013), o que permite inferir que tal expansão não vincula-se obrigatoriamente à existência de parasitemia sanguínea ativa no momento da amostragem (REQUENA et al., 2014). O perfil genético da população exposta ou fatores ambientais associados à transmissão de malária não avaliados neste estudo, tais como má-nutrição e comorbidades, também poderiam estar envolvidos na expansão de MBCs atípicas nestes sujeitos expostos (WEISS et al., 2009). Illingworth e colaboradores (2013) ainda demonstraram que somente após 5 anos de ausência de reexposição aos parasitos os níveis de MBCs atípicas se contraíram aos níveis fisiológicos, ou seja, aos níveis semelhantes aos observados em indivíduos não expostos à malária (ILLINGWORTH et al.; 2013). Interessantemente, quando foram estratificados os indivíduos expostos, porém não infectados, segundo relato de ocorrência de episódios progressos de malária, foi possível inferir que a expansão de tais células parece ser influenciada pela existência de infecções sofridas pelo indivíduo ao longo da vida. Estes achados corroboram os dados de Weiss e colaboradores (2011) que observaram que adultos peruanos infectados previamente por *P. falciparum* exibiram frequências elevadas de MBCs atípicas, se comparados aos indivíduos expostos que não relataram episódios prévios de infecções plasmodiais (WEISS et al., 2011).

Se células B atípicas influenciam ou não na indução e manutenção da imunidade antimalárica, isso permanece por ser esclarecido. Apesar disso, foi demonstrado recentemente que MBCs atípicas provenientes de indivíduos de Mali, com malária falciparum patente, superexpressam correceptores com função inibitória, particularmente FcRL5 (*Fc receptor-like-5*). Este correceptor demonstrou capacidade de modular a ativação das células B mediada pelo BCR, o que acarreta na redução da capacidade efetora de tais células (HAGA et al., 2007). Especificamente, MBCs atípicas não se mostraram aptas a secretar anticorpos ativamente ou se diferenciarem em ASCs *in vitro* (PORTUGAL et al., 2015). Estudos são fundamentais para esclarecer se a expansão de tais células é mediada exclusivamente pelo parasito ou se fatores associados à malária, tais como, comorbidades e má-nutrição contribuem para essa observação (revisto por SCHOLZEN e SAUERWEIN, 2013; HOWES et al., 2016).

Os resultados aqui apresentados confirmam que a exposição à *P. vivax* determina a ocorrência de alterações no compartimento de células B (WEISS et al., 2009; 2011; CLARK et al., 2012; NDUNGU et al., 2013; ILLINGWORTH et al., 2013; AMPOMAH et al., 2014; REQUENA et al., 2014; PORTUGAL et al., 2015; SULLIVAN et al., 2016). No entanto, ainda precisa ser elucidado se a expansão de MBCs atípicas é capaz de influenciar a eficácia de vacinas direcionadas à malária em áreas endêmicas. Em um estudo de imunização com antígenos recombinantes provenientes de *P. falciparum*, foi observado que a vacinação em indivíduos americanos foi mais eficiente em induzir MBCs e anticorpos PfAMA-1 e PfMSP-1₄₂ específicos quando comparado ao observado em adultos provenientes de área endêmica do Mali (CROMPTON et al., 2009). Resultados semelhantes foram observados no Sri Lanka, onde indivíduos que relataram prolongada exposição em áreas endêmicas de malária mostraram-se menos aptos a produzirem anticorpos específicos em resposta ao estímulo com extrato solúvel de eritrócitos infectados por *P. vivax*, se comparados aos indivíduos que relataram curta exposição áreas endêmicas para a doença (GOONEWARDENE et al.; 1990; revisto por LONGLEY et al.; 2016). Estas observações implicam em um possível impacto negativo de longas exposições aos plasmódios em estratégias de imunização (WEISS et al., 2009; PORTUGAL et al., 2015).

Em resumo, a exposição a *P. vivax* em regiões de baixa endemicidade é capaz de induzir a geração de MBCs anti-PvAMA-1_{DII} persistentes, embora as

respostas de anticorpos específicos contra esta proteína pareçam ser de curta duração. Além disso, é notada a expansão de MBCs atípicas, se comparados aos não residentes em áreas endêmicas de malária. Durante o episódio agudo de malária vivax foi observada alterações no compartimento de linfócitos B conforme previamente observado para *P. falciparum*, com destaque para expansão de imaturas e PCs, as quais retornaram aos níveis fisiológicos durante a convalescença. Estudos posteriores são de fundamental importância para determinar o impacto de tais alterações em estratégias de imunizações voltadas ao combate da malária vivax em populações expostas na Amazônia Brasileira.

Referências

- AKPOGHENETA, O. J.; DUAH, N. O.; TETTEH, DUNYO, S.; LANAR, D. E.; PINDER, M.; CONWAY, D. J. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. *Infection and immunity*, v. 76, n. 4, p. 1748-1755, 2008.
- AMEZCUA-VESELY, M. C.; BERMEJO, D. A.; MONTES, C. L.; ACOSTA-RODRÍGUEZ, E. V.; GRUPPI, A. B-cell response during protozoan parasite infections. *Journal of parasitology research*, v. 2012, p. 1-8, 2012.
- AMPOMAH, P.; STEVENSON, L.; OFORI, M. F.; BARFOD, L.; HVIID, L. Kinetics of B Cell Responses to *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 in Ghanaian Women Naturally Exposed to Malaria Parasites. *The Journal of Immunology*, v. 192, n. 11, p. 5236-5244, 2014.
- ANDERS, R. F.; CREWETHER, P. E.; EDWARDS, S.; MARGETTS, M.; MATTHEW, M. L.; POLLOCK, B.; PYE, D. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine*, v. 16, n. 2-3, p. 240-247, 1998.
- ASITO, A. S.; MOORMANN, A. M.; KIPROTICH, C.; NG'ANG'A, Z. W.; PLOUTZ-SNYDER, R.; ROCHFORD, R. Alterations on peripheral B cell subsets following an acute uncomplicated clinical malaria infection in children. *Malaria journal*, v. 7, p. 238, 2008.
- ASITO, A. S.; PIRIOU, E.; JURA, W. G. Z. O.; OUMA, C.; ODADA, O. S.; OGOLA, S.; FIORE, N.; ROCHFORD, R. Suppression of circulating IgD⁺CD27⁺ memory B cells in infants living in a malaria-endemic region of Kenya. *Malaria journal*, v. 10, p. 362, 2011.
- AYIEKO, C.; MAUE, A. C.; JURA, W. G. Z. O.; NOLAND, G. S.; AYODO, G.; ROCHFORD, R.; JOHN, C. C. Changes in B Cell Populations and Merozoite Surface Protein-1-Specific Memory B Cell Responses after Prolonged Absence of Detectable *P. falciparum* Infection. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, e67230, 2013.
- BAIRD, J. K. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today*, v. 11, n. 3, p. 105-111, 1995.
- BARBEDO, M. B.; RICCI, R.; JIMENEZ, M. C.; CUNHA, M. G.; YAZDANI, S. S.; CHITNIS, C. E.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 3, p. 335-339, 2007.
- BOCKSTAL, V.; GEURTS, N.; MAGEZ, S. Acute Disruption of Bone Marrow B Lymphopoiesis and Apoptosis of Transitional and Marginal Zone B Cells in the Spleen following a Blood-Stage *Plasmodium chabaudi* Infection in Mice. *Journal of Parasitology Research*, v. 2011, 534697, 2011.

BORHIS, G.; RICHARDS, Y. Subversion of the B-cell compartment during parasitic, bacterial, and viral infections. *BMC Immunology*, v. 16, p. 15, 2015.

BRAGA, E. M.; BARROS, R. M.; REIS, T. A.; FONTES, C. J. F.; MORAIS, C. G.; MARTINS, M. S.; KRETTLI, A. U. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 66, n. 5, p. 461-466, 2002.

BUENO, L. L.; LOBO, F. P.; MORAIS, C. G.; MOURÃO, L. C.; DE ÁVILA, R. A.; SOARES, I. S.; FONTES, C. J.; LACERDA, M. V.; OLORTEGUI, C.C.; BARTHOLOMEU, D. C.; FUJIWARA, R. T.; BRAGA, É. M. Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). *PLoS One*, v. 6, n. 6, e21289, 2011.

CALLARD, R. E.; MCCAUGHAN, G. W.; BABBAGE, J.; SOUHAMI, R. L. Specific *in vitro* antibody responses by human blood lymphocytes: apparent nonresponsiveness of PBL is due to a lack of recirculating memory B cells. *The Journal of Immunology*, v. 129, n. 1, p. 153-156, 1982.

CLARK, E. H.; SILVA, C. J.; WEISS, G. E.; LI, S.; PADILLA, C.; CROMPTON, P. D.; HERNANDEZ, J. N.; BRANCH, O. H. *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory. *Infection and immunity*, v. 80, n. 4, p. 1583-1592, 2012.

COHEN, S.; MCGREGOR, I. A.; CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*, v. 192, p. 733-737, 1961.

CROMPTON, P. D.; MIRCETIC, M.; WEISS, G.; BAUGHMAN, A.; HUANG, C. Y.; TOPHAM, D. J.; TREANOR, J. J.; SANZ, I.; LEE, F. E.; DURBIN, A. P.; MIURA, K.; NARUM, D. L.; ELLIS, R. D.; MALKIN, E.; MULLEN, G. E.; MILLER, L. H.; MARTIN, L. B.; PIERCE, S. K. The TLR9 ligand CpG promotes the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in malaria-naive individuals. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 5, p. 3318-3326, 2009.

DIAS, S.; SOMARATHNA, M.; MANAMPERI, A.; ESCALANTE, A. A.; GUNASEKERA, A. M.; UDAGAMA, P. V. Evaluation of the genetic diversity of domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA-1) and the ensuing strain-specific immune responses in patients from Sri Lanka. *Vaccine*, v. 29, n. 43, p. 7491-7504, 2011.

DORFMAN, J. R.; BEJON, P.; NDUNGU, F. M.; LANGHORNE, J.; KORTOK, M. M.; LOWE, B. S.; MWANGI, T. W.; WILLIAMS, T. N.; MARSH, K. B cell memory to 3 *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in a malaria-endemic area. *Journal of Infectious Diseases*, v. 191, n. 10, p. 1623-1630, 2005.

ELLIS, R. D.; SAGARA, I.; DOUMBO, O.; WU, Y. Blood stage vaccines for *Plasmodium falciparum*: current status and the way forward. *Human Vaccines*, v. 6, n. 8, p. 627-634, 2010.

FOWKES, F. J.; RICHARDS, J. S.; SIMPSON, J. A.; BEESON, J. G. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Medicine*, v. 7, n. 1, e1000218, 2010.

FRANÇA, CT; HE, WQ; GRUSZCZYK, J; LIM, NT; LIN, E; KINIBORO, B; SIBA, PM; THAM, WH; MUELLER, I. *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins Are Key Targets of Naturally Acquired Immunity in Young Papua New Guinean Children. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 10, n. 9, e0005014, 2016.

GOOD, M. F. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends Parasitology*, v. 21, n. 1, p. 29-34, 2005.

GOONEWARDENE, R.; CARTER, R.; PRIYNTHA GAMAGE, C.; DEL GIUDICE, G.; DAVID, P. H.; HOWIE, S.; MENDIS, K. N. Human T cell proliferative responses to *Plasmodium vivax* antigens:

evidence of immunosuppression following prolonged exposure to endemic malaria. *European journal of immunology*, v. 20, n. 6, p. 1387-1391, 1990.

HAGA, C. L.; EHRHARDT, G. R.; BOOHAKER, R. J.; DAVIS, R. S.; COOPER, M. D. Fc receptor-like 5 inhibits B cell activation via SHP-1 tyrosine phosphatase recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 23, p. 9770-9775, 2007.

HODDER, A. N.; CREWETHER, P. E.; ANDERS, R. F. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. *Infection and immunity*, v. 69, n. 5, p. 3286-3294, 2001.

HOLDER, A. A.; BLACKMAN, M. J.; BORRE, M.; BURGHHAUS, P. A.; CHAPPEL, J. A.; KEEN, J. K.; LING, I. T.; OGUN, S. A.; OWEN, C. A.; SINHA, K. A. Malaria parasites and erythrocyte invasion. *Biochemical Society Transactions*, v. 22, n. 2, p. 291-295, 1994.

HOWES, R. E.; BATTLE, K. E.; MENDIS, K. N.; SMITH, D. L.; CIBULSKIS, R. E.; BAIRD, J. K.; HAY, S. I. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 6, p. 15-34, 2016.

HVIID, L. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in Africa. *Acta Tropica*, v. 95, n. 3, p. 270-275, 2005.

HVIID, L.; BARFOD, L.; FOWKES, F. J. Trying to remember: immunological B cell memory to malaria. *Trends in Parasitology*, v. 31, n. 3, p. 89-94, 2015.

HVIID, L.; KEMP, K. What Is the Cause of Lymphopenia in Malaria? *Infection and immunity*, v. 68, n. 10, p. 6087-6089, 2000.

ILLINGWORTH, J.; BUTLER, N. S.; ROETYNCK, S.; MWACHARO, J.; PIERCE, S. K.; BEJON, P.; CROMPTON, P. D.; MARSH, K.; NDUNGU, F. M. Chronic Exposure to *Plasmodium falciparum* Is Associated with Phenotypic Evidence of Band T Cell Exhaustion. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 3, p. 1038-1047, 2013.

LANGHORNE, J.; NDUNGU, F. M.; SPONAAS, A. M.; MARSH, K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology*, v. 9, n. 7, p. 725-732, 2008.

LONGLEY, R. J.; SATTABONGKOT, J.; MUELLER, I. Insights into the naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* malaria. *Parasitology*, v. 143, n. 02, p. 154-170, 2016.

MALASPINA, A.; MOIR, S.; CHAITT, D. G.; REHM, C. A.; KOTTILIL, S.; FALLOON, J.; FAUCI, A. S. Idiopathic CD4⁺ T lymphocytopenia is associated with increases in immature/transitional B cells and serum levels of IL-7. *Blood*, v. 109, n. 5, p. 2086-2088, 2007.

MARSH, K. Malaria - a neglected disease? *Parasitology*, v. 104, Suppl S53-69, 1992.

MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanism in malaria. *Parasite Immunology*, v. 28, p. 51-60, 2006.

MITCHELL, G. H.; THOMAS, A. W.; MARGOS, G.; DLUZEWSKI, A. R.; BANNISTER, L. H. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infection and immunity*, v. 72, n. 1, p. 154-158, 2004.

MORAIS, C. G.; SOARES, I. S.; CARVALHO, L. H.; FONTES, C. J.; KRETTLI, A. U.; BRAGA, E. M. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 75, n. 4, p. 582-587, 2006.

MUELLENBECK, M. F.; UEBERHEIDE, B.; AMULIC B.; EPP, A.; FENYO, D.; BUSSE, C. E.; ESEN, M.; THEISEN, M.; MORDMÜLLER, B.; WARDEMANN, H. Atypical and classical memory B cells produce *Plasmodium falciparum* neutralizing antibodies. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 210, n. 2, p. 389-399, 2013.

- MÚFALO, B. C.; GENTIL, F.; BARGIERI, D. Y.; COSTA, F. T.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. *Microbes and infection*, v. 10, n. 12-13, p. 1266-1273, 2008.
- NDUATI, E. W.; NG, D. H.; NDUNGU, F. M.; GARDNER, P.; URBAN, B. C.; LANGHORNE, J. Distinct kinetics of memory B-cell and plasma-cell responses in peripheral blood following a blood-stage *Plasmodium chabaudi* infection in mice. *PLoS One*, v. 5, n. 11, e15007, 2010.
- NDUNGU, F. M.; OLOTU, A.; MWACHARO, J.; NYONDA, M.; APFELD, J.; MRAMBA, L. K.; FEGAN, G. W.; BEJON, P.; MARSH, K. Memory B cells are a more reliable archive for historical antimalarial responses than plasma antibodies in no-longer exposed children. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 21, p. 8247–8252, 2012.
- NDUNGU, F. M.; LUNDBLOM, K.; RONO, J.; ILLINGWORTH, J.; ERIKSSON, S.; FARNERT, A. Long-lived *Plasmodium falciparum* specific memory B cells in naturally exposed Swedish travelers. *European Journal of immunology*, v. 43, n. 11, p. 2919- 2929, 2013.
- NOGARO, S. I.; HAFALLA, J. C.; WALTHER, B.; REMARQUE, E. J.; TETTEH, K. K. A.; CONWAY, D. J.; RILEY, E. M.; WALTHER, M. The Breadth, but Not the Magnitude, of Circulating Memory B Cell Responses to *P. falciparum* Increases with Age/Exposure in an Area of Low Transmission. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, e25582, 2011.
- OLIVEIRA, T. R.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; JIMENEZ, M. C.; DEL PORTILLO, H. Á.; SOARES, I. S. Evaluation of the acquired immune responses to *Plasmodium vivax* VIR variant antigens in individuals living in malaria-endemic areas of Brazil. *Malaria journal*, v. 5, p. 83, 2006.
- OSIER, F. H.; MACKINNON, M. J.; CROSNIER, C.; FEGAN, G.; KAMUYU, G.; WANAGURU, M.; OGADA, E.; MCDADE, B.; RAYNER, J. C.; WRIGHT, G. J.; MARSH, K. New antigens for a multicomponent blood-stage malaria vaccine. *Science translational medicine*, v. 6, n. 247, 247ra102, 2014.
- POLLEY, S. D.; MWANGI, T.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; DUTTA, S.; LANAR, D. E.; REMARQUE, E.; ROSS, A.; WILLIAMS, T. N.; MWAMBINGU, G.; LOWE, B.; CONWAY, D. J.; MARSH, K. Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine*, v. 23, n. 5, p. 718-728, 2004.
- PORTUGAL, S.; DOUMTABE, D.; TRAORE, B.; MILLER, L. H.; TROYE-BLOMBERG, M.; DOUMBO, O. K.; DOLO, A.; PIERCE, S. K.; CROMPTON, P. D. B cell analysis of ethnic groups in Mali with differential susceptibility to malaria. *Malaria Journal*, v. 11, p. 162, 2012.
- PORTUGAL, S.; PIERCE, S. K.; CROMPTON, P. D. Young lives lost as B cells falter: what we are learning about antibody responses in malaria. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 7, p. 3039–3046, 2013.
- PORTUGAL, S.; TIPTON, C. M.; SOHN, H.; KONE, Y.; WANG, J.; LI, S.; SKINNER, J.; VIRTANEVA, K.; STURDEVANT, D. E.; PORCELLA, S. F.; DOUMBO, O. K.; DOUMBO, S.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA, A.; TRAORE, B.; SANZ, I.; PIERCE, S. K.; CROMPTON, P. D. Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. *eLIFE*, v. 8, e07218, 2015.
- REMARQUE, E. J.; FABER, B. W.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitology*, v. 24, n. 2, p. 74-84, 2008.
- REQUENA, P.; CAMPO, J. J.; UMBERS, A. J.; OME, M.; WANGNAPI, R.; BARRIOS, D.; ROBINSON, L. J.; SAMOL, P.; ROSANAS-URGELL, A.; UBILLOS, I.; MAYOR, A.; LÓPEZ, M.; DE LAZZARI, E.; ARÉVALO-HERRERA, M.; FERNÁNDEZ-BECERRA, C.; DEL PORTILLO, H.; CHITNIS, C. E.; SIBA, P. M.; BARDAJÍ, A.; MUELLER, I.; ROGERSON, S.; MENÉNDEZ, C.; DOBAÑO, C. Pregnancy and

malaria exposure are associated with changes in the B cell pool and in plasma eotaxin levels. *The Journal of Immunology*, v. 193, n. 6, p. 2971-2983, 2014.

RICHARDS, J. S.; BEESON, J. G. The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunology and cell biology*, v. 87, n. 5, p. 377-390, 2009.

RILEY, E. M.; ALLEN, S. J.; WHEELER, J. G.; BLACKMAN, M. J.; BENNETT, S.; TAKACS, B.; SCHÖNFELD, H. J.; HOLDER, A. A.; GREENWOOD, B. M. Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity. *Parasite Immunology*, v. 14, n. 3, p. 321-337, 1992.

RODRIGUES, M. H.; RODRIGUES, K. M.; OLIVEIRA, T. R.; CÔMODO, A. N.; RODRIGUES, M. M.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; SOARES, I. S. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *International journal for parasitology*, v. 35, n. 2, p. 185-192, 2005.

SABCHAREON, A.; BURNOUF, T.; OUATTARA, D.; ATTANATH, P.; BOUHAROUN-TAYOUN, H.; CHANTAVANICH, P.; FOUCAULT C, CHONGSUPHAJASIDDHI T, DRUILHE P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 45, n. 3, p. 297-308, 1991.

SÁNCHEZ-ARCILA, J. C.; DE FRANÇA, M. M.; PEREIRA, V. A.; VASCONCELOS M. P.; TÊVA, A.; PERCE-DA-SILVA, D. S.; NETO, J. R.; APRÍGIO, C. J.; LIMA-JUNIOR, J. C.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S.; BANIC, D. M.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. The influence of intestinal parasites on *Plasmodium vivax*-specific antibody responses to MSP-1₁₉ and AMA-1 in rural populations of the Brazilian Amazon. *Malaria journal*, v. 14, p. 442, 2015.

SCHOLZEN, A.; SAUERWEIN, R. W. How malaria modulates memory: activation and dysregulation of B cells in *Plasmodium* infection. *Trends in parasitology*, v. 29, n. 5, p. 252-262, 2013.

SCHOLZEN, A.; TEIRLINCK, A. C.; BIJKER, E. M.; ROESTENBERG, M.; HERMSEN, C. C.; HOFFMAN, S. L.; SAUERWEIN, R. W. BAFF and BAFF receptor levels correlate with B cell subset activation and redistribution in controlled human malaria infection. *The Journal of Immunology*, v. 192, n. 8, p. 3719–3729, 2014.

SETH, R. K.; BHAT, A. A.; RAO, D. N.; BISWAS, S. Acquired immune response to defined *Plasmodium vivax* antigens in individuals residing in northern India. *Microbes and infection*, v. 12, n. 3, p. 199-206, 2010.

SOARES, I. S.; DA CUNHA, M. G.; SILVA, M. N.; SOUZA, J. M.; DEL PORTILLO, H. Á.; RODRIGUES, M. M. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 60, n. 3, p. 357-363, 1999 .

STOWERS, A. W.; KENNEDY, M. C.; KEEGAN, B. P.; SAUL, A.; LONG, C. A.; MILLER, L. H. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. *Infection and immunity*, v. 70, n. 12, p. 6961-6967, 2002.

STRUIK, S. S.; RILEY, E. M. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunological Reviews*, v. 201, p. 268-290, 2004.

SUBRAMANIAM, K. S.; SKINNER, J.; IVAN, E.; MUTIMURA, E.; KIM, R. S.; FEINTUCH, C. M.; DAILY, J. P. HIV Malaria Co-Infection Is Associated with Atypical Memory B Cell Expansion and a Reduced Antibody Response to a Broad Array of *Plasmodium falciparum* Antigens in Rwandan Adults. *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, e0124412, 2015.

SULLIVAN, R. T.; KIM, C. C.; FONTANA, M. F.; FEENEY, M. E.; JAGANNATHAN, P.; BOYLE, M. J.; DRAKELEY, C. J.; SSEWANYANA, I.; NANKYA, F.; MAYANJA-KIZZA, H.; DORSEY, G.; GREENHOUSE, B. FCRL5 Delineates Functionally Impaired Memory B Cells Associated with *Plasmodium falciparum* Exposure. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 5, e1004894, 2015.

SULLIVAN, R. T.; SSEWANYANA, I.; WAMALA, S.; NANKYA, F.; JAGANNATHAN, P.; TAPPERO, J. W.; MAYANJA-KIZZA, H.; MUHINDO, M. K.; ARINAITWE, E.; KAMYA, M.; DORSEY, G.; FEENEY, M. E.; RILEY, E. M.; DRAKELEY, C. J.; GREENHOUSE, B.; SULLIVAN, R. B cell sub-types following acute malaria and associations with clinical immunity. *Malaria journal*, v. 3, n. 15, p. 139, 2016.

TRAORE, B.; KONÉ, Y.; DOUMBO, S.; DOUMTABÉ, D.; TRAORÉ, A.; CROMPTON, P. D.; PIERCE, S. K. The TLR9 agonist CpG fails to enhance the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in semi-immune adults in Mali. *Vaccine*, v. 27, n. 52, p. 7299-7303, 2009.

TRIGLIA, T.; HEALER, J.; CARUANA, S. R.; HODDER, A. N.; ANDERS, R. F.; CRABB, B. S.; COWMAN, A. F. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Molecular microbiology*, v. 38, n. 4, p. 706-718, 2000.

UDHAYAKUMAR, V.; KARIUKI, S.; KOLCZACK, M.; GIRMA, M.; ROBERTS, J. M.; OLOO, A. J.; NAHLEN, B. L.; LAL, A. A. Longitudinal study of natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, n. 2, p. 100-107, 2001.

WEISS, G. E.; CLARK, E. H.; LI, S.; TRAORE, B.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA, A.; HERNANDEZ, J. N.; DOUMBO, O. K.; PIERCE, S. K.; BRANCH, O. H.; CROMPTON, P. D. A positive correlation between atypical memory B cells and *Plasmodium falciparum* transmission intensity in cross-sectional studies in Peru and Mali. *PLoS ONE*, v. 6, n. 1, e15983, 2011.

WEISS, G. E.; CROMPTON, P. D.; LI, S.; WALSH, L. A.; MOIR, S.; TRAORE, B.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA, A.; DOUMBO, O. K.; PIERCE, S. K. Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. *The Journal of Immunology*, v. 183, n. 3, p. 2176–2182, 2009.

WEISS, G. E.; TRAORE, B.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA, A.; DOUMBO, S.; DOUMTABÉ, D.; KONE, Y.; DIA, S.; GUINDO, A.; TRAORE, A.; HUANG, C. Y.; MIURA, K.; MIRCETIC, M.; LI, S.; BAUGHMAN, A.; NARUM, D. L.; MILLER, L. H.; DOUMBO, O. K.; PIERCE, S. K.; CROMPTON, P. D. The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 5, e1000912, 2010.

WICKRAMARACHCHI, T.; PREMARATNE, P. H.; PERERA, K. L.; BANDARA, S.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; HANDUNNETTI, S. M.; UDAGAMA-RANDENIYA, P. V. Natural human antibody responses to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. *Infection and immunity*, v. 74, n. 1, p. 798-801, 2006.

ZAKERI, S.; SADEGHI, H.; MEHRIZI, A. A.; DJADID, N. D. Population genetic structure and polymorphism analysis of gene encoding apical membrane antigen-1 (AMA-1) of Iranian *Plasmodium vivax* wild isolates. *Acta tropica*, v. 126, n. 3, p. 269-279, 2013.

WIPASA, J.; ELLIOTT, S.; XU, H.; GOOD, M. F. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. *Immunology and cell biology*, v. 80, n. 5, p. 401-414, 2002.

WIPASA, J.; SUPHAVILAI, C.; OKELL, L. C.; COOK, J.; CORRAN, P. H.; THAIKLA, K.; LIEWSAREE, W.; RILEY, E. M.; HAFALLA, J. C. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 2, e1000770, 2010.

6 DISCUSSÃO GERAL

Embora os esforços de controle tenham possibilitado a redução significativa da morbidade e mortalidade dos indivíduos afetados, a malária permanece até os dias atuais como grave problema de saúde pública mundial (WHO, 2015). Dentre as medidas de controle contra o avanço desta enfermidade está o desenvolvimento de uma vacina que confira proteção de maneira eficaz e duradoura (GOOD et al., 2005; DRUILHE e BARNWELL, 2007; ENGWERDA et al., 2012). Recentemente foi licenciada a primeira vacina direcionada exclusivamente ao combate à malária falciparum, denominada RTS,S/AS01 (Mosquirix[®], GlaxoSmithKline). No entanto, apesar de grandes expectativas geradas pela comunidade científica, a mesma demonstrou conferir reduzida proteção às crianças africanas contra o desenvolvimento de malária grave ocasionada por esta espécie de plasmódio (AGNANDJI et al., 2011; AGNANDJI et al., 2012).

Pesquisas vacinais focadas na malária vivax têm sido desenvolvidas de maneira mais lenta, frequentemente orientadas por estudos focados em *P. falciparum*. A negligência atribuída à malária vivax ao longo dos anos pode ser explicada, dentre outros fatores, pelo fato de *P. vivax* ter sido associado, até então, a apenas casos não letais da doença, bem como à falta de metodologia de cultivo contínuo *in vitro* de longa duração e à escassez de modelos animais para avaliação de candidatos vacinais *in vivo*. Atualmente, relatos crescentes de casos graves e trabalhos comprovando que *P. vivax* seja refratário às medidas de controle adotadas tradicionalmente, demonstram o quanto estudos direcionados a esta espécie são de fundamental relevância (MUELLER, SHAKRI e CHITNIS, 2015).

No Brasil, *P. vivax* é associado à cerca de 85% dos episódios de malária (WHO, 2015). Além disso, poucos estudos têm sido conduzidos com a finalidade de entender os fatores geradores e reguladores de memória imunológica focados em células B. A maior parte dos trabalhos realizados até o momento foram estudos sorológicos que correlacionaram níveis de anticorpos ou citocinas séricas com presença/ausência de sintomas clínicos ou risco de infecção. Sabendo-se que a memória imunológica antígeno-específica é a base para o desenvolvimento de

vacinas seguras e eficazes (SALLUSTO et al, 2010), este presente estudo foi elaborado com a finalidade de conhecer, em âmbito fenotípico e funcional, características imunológicas associadas ao compartimento de células B em indivíduos expostos na Amazônia Brasileira durante o episódio agudo, bem como em distintas fases da convalescença de malária vivax.

Embora o sistema imune humano seja, de maneira geral, capaz de detectar rapidamente a presença dos plasmódios, “reagindo” à presença dos mesmos através da sintomatologia e promovendo alterações em parâmetros sanguíneos dentre outras modificações, sabe-se que imunidade naturalmente adquirida se desenvolve lentamente após múltiplas exposições, podendo ser alcançada a imunidade clínica, porém, raramente é observada a proteção estéril (BAIRD, 1998; DOOLAN et al., 2009). Desta maneira, no que se refere ao controle dos plasmódios durante o estágio sanguíneo da doença, destacam-se os anticorpos (COHEN et al., 1961, SABCHAREON et al., 1991). Os mecanismos efetores exercidos por estas proteínas não são totalmente esclarecidos e incluem inibição da invasão dos merozoítos aos eritrócitos, prevenção da adesão dos eritrócitos parasitados aos tecidos e opsonização dos merozoítos/eritrócitos parasitados para captação pelas células fagocíticas. Estudos apontam que o nível de resposta e o número de antígenos reconhecidos sejam componentes críticos para ocorrência de imunidade humoral protetora (OSIER et al., 2008; CROMPTON et al., 2010; BARRY et al., 2011; TRIEU et al., 2011). Neste estudo foi avaliada a geração e persistência de anticorpos (IgG totais) e MBCs direcionados a dois importantes candidatos de estágio sanguíneo de *P. vivax*, representados por PvAMA-1 e PvMSP-9, a fim de se confirmar o potencial imunogênico de tais antígenos sintéticos. Através da análise da resposta naturalmente adquirida aos peptídeos PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808) corroborou-se a imunogenicidade dos mesmos em amostras plasmáticas obtidas de indivíduos naturalmente expostos à malária em regiões endêmicas da Amazônia Brasileira (BUENO et al., 2011; RODRIGUES-DA-SILVA et al., 2016). O seguimento de tais indivíduos permitiu observar também que grande parte dos soropositivos na fase aguda de malária vivax persistiram no período da convalescença. Pelo menos metade dos pacientes negativos durante o episódio clínico soroconverteram-se após 180 dias do tratamento/diagnóstico de malária. Além disso, sugeriu-se também longa duração na produção destas imunoglobulinas, embora em níveis (IR) reduzidos em todos os pontos amostrados.

Do mesmo modo, em investigação longitudinal conduzida na Índia, Biswas e colaboradores (2008) observaram que crianças infectadas por *P. falciparum* exibiram persistência de IgGs específicas a um peptídeo sintético de fase sanguínea elaborado a partir de MSP-1 (18 aa) por até 5 meses após o tratamento da doença (BISWAS et al., 2008). Similarmente, Kaddumukasa e colaboradores (2015) avaliaram a resposta naturalmente adquirida de indivíduos residentes em áreas de moderada transmissão de malária na África aos peptídeos sintéticos elaborados a partir de regiões antigênicas das proteínas de *P. falciparum* denominadas proteína rica em glutamato (*Glutamate-rich protein* - GLURP) (23 aa), MSP-3 (28 aa) e proteína II rica em histidina (*Histidine-Rich Protein II* - HRP-II) (27 aa). Em seu estudo, foi observada elevação dos níveis de IgG específicas aos peptídeos sintéticos de fase sanguínea no período de 42 dias após o diagnóstico/tratamento de malária falciparum não-complicada (KADDUMUKASA et al., 2015). É importante destacar que não foram encontrados na literatura estudos longitudinais que avaliaram simultaneamente respostas naturalmente adquiridas de anticorpos direcionadas aos peptídeos sintéticos de *P. vivax* durante e após o episódio agudo de malária.

No intuito de traçar um paralelo com perfil de imunogenicidade observados aos peptídeos sintéticos, foi avaliada também respostas de IgGs totais e MBCs à proteína recombinante PvAMA-1_{DII}. Observou-se magnitude de resposta (IR) acentuada de IgGs totais durante a fase aguda de malária vivax, seguida de redução progressiva dos IR com o a eliminação dos parasitos e decorrer da convalescença. Controles expostos, porém não infectados, exibiram IR semelhante aos convalescentes em 180 dias após o diagnóstico/tratamento. Foi observada baixa taxa soroconversão no período de convalescença, o que em conjunto, permitiu sugerir a ocorrência de respostas de curta duração após a eliminação da infecção ocasionada por *P. vivax*. A persistência destas respostas depende de uma série de fatores tais como a fase da coleta da amostra biológica (malária aguda vs. convalescença), idade (crianças vs. adultos), número de episódios prévios, nível de exposição, características dos antígenos avaliados dentre outros fatores. Neste sentido, Soares e colaboradores (1999) observaram rápido declínio de anticorpos específicos para a proteína recombinante PvMSP-1 ao longo de 2-4 meses após a malária vivax aguda em área endêmica de malária da Amazônia Brasileira (SOARES et al., 1999). Do mesmo modo, também foram observados anticorpos de curta

duração contra as proteínas PvDBP-II e PvAMA-1 (ectodomínio) após a malária vivax em indivíduos após breve surto de malária em Minas Gerais (CERÁVOLO et al., 2009). Por outro lado, Wipasa et al. (2010) relataram respostas de longa duração na produção de anticorpos contra as proteínas PvAMA-1 (ectodomínio), PvMSP-1₁₉ e PvDBP-II, em indivíduos não infectados que relataram episódios prévios de malária há, pelo menos, 6 anos antes da coleta da amostra biológica em áreas de extrema baixa transmissão da Tailândia (WIPASA et al., 2010). Sabe-se que, após o estímulo antigênico, os títulos dos anticorpos específicos tendem a elevar-se significativamente para, em seguida, entrar em fase de decaimento bifásico. Esta fase é constituída de um rápido declínio em relação ao pico inicial sendo, de acordo com o antígeno avaliado, acompanhada de decaimento lento ao longo dos anos subsequentes ou caracterizado por manutenção de imunidade protetora de longa duração (AMANNA e SLIFKA, 2010). Assim, estudos que estimaram a meia-vida de anticorpos após o episódio clínico de malária, ou seja, 1º fase de decaimento, relataram curta duração da resposta para antígenos de merozoítos e gametócitos, variando de 2 semanas (KINYANJUI et al., 2007; AKPOGHENETA et al., 2008) há aproximadamente 12 semanas (BOUSEMA et al., 2012). Por outro lado, estudos que realizaram amostragem na 2º fase de decaimento, relatam meia vida de longa duração (WIPASA et al., 2010).

É importante enfatizar que, nesse estudo, os resultados provenientes do uso de peptídeos sintéticos são bastante peculiares e destoam-se do perfil de imunogenicidade observado para a proteína recombinante PvAMA-1_{DII} no mesmo conjunto de amostras plasmáticas avaliado. Dentre as principais diferenças destacam-se a magnitude de resposta de IgGs (especialmente durante a fase aguda de malária vivax), persistência dos anticorpos e perfil de soroconversão na convalescença (ANEXO G). Deverão ser mais bem investigadas as vantagens e desvantagens dos diferentes perfis sorológicos conferidos pela natureza distinta destes antígenos (peptídeo/proteína recombinante), no intuito de se traçar com maior eficácia estratégias vacinais direcionadas no combate à malária.

É bem estabelecido que respostas humorais persistentes, fundamentais para o sucesso da aquisição e manutenção de imunidade, dependem da geração tanto de células B de memória (MBCs), quanto de células plasmáticas de longa vida (LLPCs) (GOOD-JACOBSON et al., 2010; AMANNA e SLIFKA, 2010). LLPCs residem na medula óssea onde secretam constitutivamente anticorpos que auxiliam como

primeira linha de defesa no caso de reinfecções. Já as MBCs são descritas como “quiescentes”, sendo caracterizadas pela capacidade de responder, proliferar e se diferenciar mais rapidamente em células plasmáticas secretoras de anticorpos em infecções subsequentes, se comparadas às células B naives (TANGYE e TARLINGTON, 2009).

Para investigar a ocorrência de MBCs malária específicas em indivíduos residentes em áreas de transmissão instável da Amazônia Brasileira, utilizou-se um protocolo otimizado, descrito por Jahnmatz e colaboradores (2013). Esta metodologia permitiu o aumento da sensibilidade de detecção, bem como a redução do tempo de incubação empregado. Até então, os experimentos de investigação da memória imunológica focada em células B eram baseados na pré-estimulação de PBMCs por 5-6 dias, sendo utilizados CpG (agonista TLR-9), pokeweed mitógeno (PWM) e *Staphylococcus aureus* Cowan (SAC), combinado com CD40L e/ou citocinas tais como IL-2 e IL-10 (CROTTY et al., 2003; 2004, BUISMAN et al., 2009; CAO et al., 2010). Neste presente estudo, a pré-estimulação foi realizada em apenas 3 dias, com aplicação de dois estímulos: Resiquimod (R-848, agonista de TLR-7 e TLR-8) (GORDEN et al., 2006) e IL-2. Em PBMCs totais, R-848 estimula diretamente as MBCs, as quais, constitutivamente expressam TLR-7 (BERNASCONI et al., 2003), bem como células mielóides, as quais, expressam TLR-8 e produzem citocinas que auxiliarão na proliferação e diferenciação de células B. IL-2 é fator de crescimento para células T, NK e B (MINGARI et al., 1984; BERNASCONI, TRAGGIAI e LANZAVECCHIA, 2002). Em seguida, prosseguiu-se as etapas do ELISpot propriamente dito, caracterizadas por sensibilização, incubação e revelação (JAHNMATZ et al., 2013).

Os resultados aqui obtidos demonstraram que, embora o padrão de resposta de anticorpos contra os peptídeos sintéticos se divergirem do exibido pela proteína recombinante nos ensaios de ELISA, quando avaliada a responsividade de MBCs frente aos antígenos específicos (peptídeos/proteína) através ferramenta do ELISpot, foi notado que o número ($/10^6$ PBMCs) bem como os percentuais (%) de MBCs específicas se mostraram bastante semelhantes para PvMSP-9_(E795-A808), PvAMA-1_(S290-K307) e PvAMA_{DII}. Em todos os casos, MBCs se fizeram presentes persistentemente em todos os grupos compostos por indivíduos residentes em áreas endêmicas, embora não tenha se correlacionado aos IRs exibidos por seus respectivos antígenos em todas as fases avaliadas neste estudo (agudos,

convalescentes e expostos) (dados não exibidos para PvAMA_{DII}). Estudos que investigaram a relação entre níveis de IgGs e MBCs específicas aos antígenos de *Plasmodium* também apontam resultados conflitantes (MIGOT et al., 1995; DORFMAN et al., 2005; WIPASA et al., 2010; NOGARO et al.; 2011; NDUNGU et al., 2012; AYIEKO et al., 2013; AMPOMAH et al., 2014). Os trabalhos que corroboram a existência de correlação entre níveis de IgGs e MBCs específicas sugerem que células plasmáticas secretoras de anticorpos sejam oriundas do conjunto de MBCs em repouso, as quais originam imunoglobulinas de longa duração (DORFMAN et al., 2005; CROMPTON et al., 2009; NDUNGU et al., 2012). Por outro lado, pesquisas que indicam ausência desta correlação apontam que LLCs na medula óssea e MBCs sejam populações celulares reguladas de maneira independente, desta maneira, a ativação de MBCs não parece ser obrigatória para que se tenha a manutenção/persistência de anticorpos plasmáticos (WIPASA et al., 2010; NOGARO et al.; 2011; AYIEKO et al., 2013; AMPOMAH et al., 2014). É importante enfatizar que, até os dias atuais, a dinâmica entre as distintas populações de células B no contexto da memória imunológica permanece pouco compreendida (CROMPTON et al., 2009).

Comparar os resultados obtidos neste trabalho com o único estudo disponível na literatura, o qual avaliou resposta de MBCs frente aos antígenos de *P. vivax* (proteínas PvAMA-1 ectodomínio, PvMSP-1₁₉ e PvDBP-II) é uma tarefa árdua, tendo em vista que Wipasa e colaboradores (2010) utilizaram para realização de seus experimentos de ELISpot, o protocolo tradicional de Crotty et al. (2003), o qual esteve associado à respostas de MBCs específicas em menor magnitude. Além disso, os autores não avaliaram a resposta destas MBCs durante a fase aguda de malária vivax, mas apenas em indivíduos não infectados que relataram episódios prévios de malária há, pelo menos, 6 anos anteriores à coleta da amostra biológica em áreas de extremamente baixa transmissão de malária (WIPASA et al., 2010). Assim, esse trabalho é o primeiro a avaliar simultaneamente os padrões de resposta imune e indução de células B de memória em indivíduos na fase aguda e convalescença da malária vivax.

A princípio, embora *P. falciparum* e *P. vivax* sejam espécies de plasmódios com características biológicas distintas, estas diferenças impossibilitariam que observações obtidas para uma espécie sejam extrapoladas para a outra. No entanto, em um estudo conduzido por Ampomah e colaboradores (2014), quando avaliadas

as respostas de MBCs de mulheres africanas grávidas em área de alta transmissão de *P. falciparum* às proteínas elaboradas a partir de PfEMP-1 e ao antígeno não malárico representado pelo toxóide tetânico (TT), foi observado, através da utilização do protocolo otimizado de ELISpot (JAHNMATZ et al., 2013), número de MBCs específicas ($/10^6$ PBMCs) bastante similares aos obtidos neste presente trabalho (AMPOMAH et al., 2014). Com a intenção de compreender estes achados, Nogaro e colaboradores (2011) hipotetizaram que a similaridade da resposta de MBCs observada entre diferentes autores poderia ser atribuída às limitações da técnica de ELISpot, ao invés de refletir fenômenos biológicos reais. Em seu estudo, do mesmo modo, foram observados percentuais semelhantes de MBCs específicas aos antígenos maláricos de *P. falciparum* e ao toxóide diftérico (TD), o que sugere que montar uma resposta de células B aos antígenos maláricos não seja mais complexo que para outros antígenos associados à memória imunológica de longa duração (NOGARO et al., 2011). Estas suposições talvez ajudem a justificar o fato de que, neste trabalho, embora os peptídeos avaliados sejam constituídos por sequências curtas de aminoácidos e, provavelmente possuam menor número de epítomos disponíveis para reconhecimento imune se comparado às proteínas recombinantes (14 aa para PvMSP-9_(E795-A808) versus 244 aa para PvMSP9-RIRII₇₂₉₋₉₇₂ e 18aa para PvAMA-1_(S290-K307) versus 137 aa para PvAMA-1_{DII}), tenham sido observado respostas similares de MBCs específicas.

Levando em consideração a escassez de estudos direcionados a conhecer o perfil do compartimento de células B, principalmente durante o episódio agudo de malária vivax, investigou-se neste trabalho, qual o impacto da exposição à malária em regiões de baixa endemicidade da Amazônia Brasileira, onde infecções ocasionadas por *P. vivax* predominam. Para avaliação das flutuações neste compartimento por citometria de fluxo foram utilizadas estratégias fenotípicas semelhantes às empregadas por Illingworth e colaboradores (2013), onde a combinação dos marcadores fenotípicos CD19, CD10, CD20, CD21 e CD27 têm permitido a identificação de seis subtipos distintos de células B denominadas imaturas, naives, MBCs clássicas, MBCs atípicas, MBCs ativadas e PCs (ILLINGWORTH et al., 2013). Dentre as principais flutuações fenotípicas observadas neste trabalho destacaram-se proporções aumentadas de imaturas, PCs e MBCs atípicas, sendo as duas primeiras, sobretudo, presentes durante a fase aguda de malária vivax. Considerando que trabalhos que avaliaram a cinética de células B

durante a malária falciparum e convalescença são bastante escassos, sendo realizados prioritariamente em crianças e em regiões de alta endemicidade da doença (ASITO et al., 2008; ASITO et al., 2011; SULLIVAN et al., 2016) e inexistentes na malária vivax, reforça a importância dos resultados inéditos aqui exibidos, os quais, apresentaram similaridade aos exibidos em exposições associadas a *P. falciparum*.

Na tentativa de compreender o papel da expansão de imaturas na infecção plasmodial, Sullivan e colaboradores (2016) observaram que crianças africanas mais susceptíveis à doença exibiram, durante o episódio agudo de malária, frequências aumentadas de B imaturas ($CD19^+CD10^+$), se comparadas às consideradas com maior imunidade à malária falciparum (SULLIVAN et al., 2016). O papel das células B imaturas durante a malária necessita ser melhor investigado visto que aquelas que apresentam fenótipo $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ são descritas como capazes de exercer funções reguladoras. Realmente Blair e colaboradores (2010) demonstraram que tais células foram capazes de suprimir a diferenciação de linfócitos T através de contato e via secreção de IL-10 (BLAIR et al., 2010). Estudos posteriores são necessários para determinar se a expansão deste subtipo de B observada pontualmente durante o episódio agudo de malária vivax seria capaz de interferir realmente com o estabelecimento da imunidade contra a doença e como tais células são capazes de exibir propriedades imunomodulatórias importantes no contexto da infecção.

Em relação às PCs, observações conduzidas neste trabalho estão de acordo com estudos prévios que apontam que tais células podem ser observadas temporariamente expandidas no sangue periférico após o estímulo antigênico, representado pela infecção plasmodial patente (NDUATI et al., 2010; CLARK et al., 2012; SULLIVAN et al., 2016). PCs observadas na periferia compreendem majoritariamente células de vida-curta (SLPCs), as quais, são geradas imediatamente após a infecção ou, em caso de reexposições, podem ser oriundas da diferenciação de MBCs em ASCs/PCs (TARLINGTON et al., 2008; WRAMMERT et al., 2008). Tais células são consideradas efetoras da imunidade humoral uma vez que são responsáveis diretamente pela produção de anticorpos. Tendo em vista a curta permanência de tais células no sangue de indivíduos infectados, nem sempre os estudos focados na análise de tais flutuações são capazes de detectar alterações neste subtipo celular (WEISS et al., 2009; ILLINGWORTH et al., 2013).

Os dados obtidos neste estudo apontam que a expansão de MBCs atípicas demonstrou ser influenciada pela exposição à malária e não apenas restrita a condição que o indivíduo se encontra, tal como fase aguda ou convalescença. A expansão de atípicas em indivíduos expostos à malária falciparum foi exhaustivamente descrita (WEISS et al., 2009; 2010; 2011; NOGARO et al., 2011; CLARK et al., 2012; AYIEKO et al., 2013; ILLINGWORTH et al., 2013; NDUNGU et al., 2013; MUELLENBECK et al., 2013; AMPOMAH et al., 2014; REQUENA et al., 2014; SCHOLZEN et al., 2014; PORTUGAL et al., 2015; SUBRAMANIAM et al., 2015; SULLIVAN et al., 2016), além de parecer ser relacionada à ocorrência de episódios progressos da doença, o que corrobora com os achados de Weiss e colaboradores (2011) em adultos peruanos expostos em regiões de baixa endemicidade de malária falciparum (WEISS et al., 2011). Apenas um trabalho disponível na literatura foi direcionado a investigar tal expansão em população exposta a *P. vivax* em área de alta endemicidade de Papua Nova Guiné (PNG), se comparados à população não exposta residente na Espanha (REQUENA et al., 2014). Embora não se saiba, até os dias atuais, quais fatores possam estar associados à diferenciação para MBCs atípicas em detrimento às MBCs clássicas e qual o papel específico de MBCs atípicas na indução e manutenção da memória imunológica focada em células B (revisto por KUROSAKI et al., 2015), estudos apontam que tais células apresentam funções efetoras comprometidas, se comparadas às MBCs clássicas (HAGA et al., 2007; PORTUGAL et al., 2015, SULLIVAN et al., 2015).

Embora outros trabalhos tenham descrito a expansão de MBCs ativadas e clássicas, bem como redução de B naives em indivíduos de Mali e Peru expostos à *P. falciparum*, se comparados aos não expostos residentes nos Estados Unidos (WEISS et al., 2009; 2011), este fenômeno foi atribuído ao acúmulo de experiências imunológicas em populações expostas à malária (WEISS et al., 2011). Trabalhos que realizaram o seguimento de populações africanas durante a fase aguda e convalescença de malária falciparum apontaram resultados bastante controversos no que diz respeito às oscilações ocorridas em naives, MBCs clássicas e ativadas (ASITO et al., 2008; WEISS et al., 2010; SULLIVAN et al., 2016), diferente das observações realizadas para de B imaturas, PCs e MBCs atípicas, as quais, parecem ser mais consensuais. Apesar deste e outros estudos terem revelado uma série de modificações em aspectos funcionais e composição do compartimento de

linfócitos B em indivíduos expostos à malária, pesquisas com maior profundidade no assunto são necessárias para explicar as causas de tais observações e clarificar como estas alterações possam impedir (ou mesmo contribuir) para a geração da memória imunológica humoral eficaz.

Embora este trabalho tenha apresentado limitações, os dados aqui exibidos corroboram os trabalhos que indicaram que seja possível o alcance e manutenção da imunidade naturalmente adquirida a *P. vivax* em regiões de baixa transmissão da doença. A imunogenicidade dos peptídeos sintéticos PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808) durante infecções naturais humanas foi confirmada, sendo associada às respostas persistentes de anticorpos e MBCs específicas, embora variações individuais nas respostas aconteçam. A exposição à malária vivax mostrou associação com distintas alterações no compartimento de células B, com proporções alteradas de alguns subtipos, tais como, imaturas e PCs durante a malária aguda e MBCs atípicas expandidas em indivíduos expostos nas áreas endêmicas brasileiras. Estes resultados apontam que, embora *P. vivax* e *P. falciparum* sejam espécies que apresentam comportamentos biológicos bastante distintos, destacando-se a capacidade de *P. vivax* infectar reticulócitos, formar hipnozoítos, estar associado ao aparecimento precoce de gametócitos se comparado à *P. falciparum* (CARLTON et al., 2008), ambas as espécies se mostraram aptas a induzirem flutuações fenotípicas similares neste compartimento linfocitário.

Um pensamento interessante foi lançado por Langhorne e colaboradores (2008), os quais definiram a malária como capaz de gerar mais perguntas que respostas. Neste sentido, algumas questões importantes permanecem por ser elucidadas, por exemplo:

- O que se deseja de uma vacina antimalárica? Que a mesma induza uma resposta que mimifique a imunidade naturalmente adquirida, protegendo contra elevação da parasitemia sanguínea e agravamento dos sintomas clínicos ou que a mesma promova imunidade estéril?
- Quais são as características críticas para desenvolvimento de uma resposta imune protetora (número de antígenos reconhecidos, nível de resposta e populações celulares moduladas)?
- Qual é o impacto da responsividade potencialmente alterada dos subtipos de células B induzida pela exposição aos parasitos na iniciação e *recall* de respostas humorais em campanhas de vacinação?

- Qual a duração destas alterações no compartimento de B na ausência de exposição aos plasmódios?

A elucidação destas, dentre outras questões, poderá fornecer pistas importantes para o desenvolvimento de estratégias vacinais seguras e eficazes, fundamentais ao combate a este flagelo histórico da humanidade.

7 CONCLUSÕES

- Em áreas de baixa endemicidade indivíduos relatando ≥ 1 episódio progressivo de malária, quando comparados a sujeitos primoinfectados, tendem a demonstrar taxas reduzidas de parasitos circulantes, o que sugere o estabelecimento de fatores relacionados à imunidade, capazes de controlar o desenvolvimento do parasito;
- Visto que a busca pelo diagnóstico e tratamento da infecção malárica pelos indivíduos envolvidos nesse estudo ocorreu dentro de 2-3 dias do início dos sintomas, pode-se sugerir que infecção malárica causada por *P. vivax* é capaz de rapidamente induzir plaquetopenia, linfopenia e leucopenia, as quais são normalizadas rapidamente após o tratamento da doença;
- A plaquetopenia parece ser fortemente dependente das taxas de parasitos circulantes;
- Indivíduos com malária vivax aguda apresentaram MBCs e anticorpos circulantes específicos para os peptídeos sintéticos PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808), bem como para a proteína recombinante PvAMA-1_{DII}. No entanto, enquanto os níveis de anticorpos reconhecendo peptídeos específicos mostraram-se inferiores ao observados para a proteína recombinante PvAMA-1_{DII}, eles tenderam a ser mais estáveis após o tratamento da infecção;
- Para os antígenos plasmodiais avaliados neste trabalho, não foram encontradas associações entre níveis de anticorpos (IgG totais) e percentuais de MBCs específicas com o decorrer do tempo;
- A detecção de anticorpos malária específicos na ausência de MBCs, e vice-versa, observada em nosso e em outros estudos, nos levam a questionar,

dentre outros fatores, as estratégias preconizadas para avaliação dessas respostas;

- Assim como observado durante a malária falciparum, indivíduos durante o episódio agudo de malária vivax apresentam alterações no compartimento de linfócitos B, com destaque para expansão de imaturas e PCs, as quais retornaram aos níveis fisiológicos durante a convalescença. Isso sugere que parasitos com comportamentos biológicos distintos podem induzir respostas imunes semelhantes;
- A expansão de MBCs atípicas foi observada em todos os grupos avaliados, incluindo CE. Aparentemente, essa expansão não é dependente somente do fator exposição, mas parece ter associação com a ocorrência de infecções maláricas pregressas;
- Outros estudos são necessários para determinar os impactos das variações das subpopulações de células B possivelmente decorrentes de esquemas de vacinação.

REFERÊNCIAS

AGEMATSU, K.; NAGUMO, H.; YANG, F. C.; NAKAZAWA, T.; FUKUSHIMA, K.; ITO, S.; SUGITA, K.; MORI, T.; KOBATA, T.; MORIMOTO, C.; KOMIYAMA, A. B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27⁺ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *European Journal of immunology*, v. 27, n. 8, p. 2073–2079, 1997.

AGNANDJI, S.T.; LELL, B.; SOULANOUDJINGAR, SS; FERNANDES, JF; ABOSSOLO, BP; CONZELMANN, C; METHOGO, BG; DOUCKA, Y; FLAMEN, A; MORDMÜLLER, B; ISSIFOU, S; KREMSNER, PG; SACARLAL, J; AIDE, P; LANASPA, M; APONTE, JJ; NHAMUAVE, A; QUELHAS, D; BASSAT, Q; MANDJATE, S; MACETE, E; ALONSO, P; ABDULLA, S; SALIM, N; JUMA, O; SHOMARI, M; SHUBIS, K; MACHERA, F; HAMAD, AS; MINJA, R; MTORO, A; SYKES, A; AHMED, S; URASSA, AM; ALI, AM; MWANGOKA, G; TANNER, M; TINTO, H; D'ALESSANDRO, U; SORGHO, H; VALEA, I; TAHITA, MC; KABORÉ, W; OUÉDRAOGO, S; SANDRINE, Y; GUIGUEMDÉ, RT; OUÉDRAOGO, JB; HAMEL, MJ; KARIUKI, S; ODERO, C; ONEKO, M; OTIENO, K; AWINO, N; OMOTO, J; WILLIAMSON, J; MUTURI-KIOI, V; LASERSON, KF; SLUTSKER, L; OTIENO, W; OTIENO, L; NEKOYE, O; GONDI, S; OTIENO, A; OGUTU, B; WASUNA, R; OWIRA, V; JONES, D; ONYANGO, AA; NJUGUNA, P; CHILENGI, R; AKOO, P; KERUBO, C; GITAKA, J; MAINGI, C; LANG, T; OLOTU, A; TSOFA, B; BEJON, P; PESHU, N; MARSH, K; OWUSU-AGYEI, S; ASANTE, KP; OSEI-KWAKYE, K; BOAHEN, O; AYAMBA, S; KAYAN, K; OWUSU-OFORI, R; DOSOO, D; ASANTE, I; ADJEI, G; ADJEI, G; CHANDRAMOHAN, D; GREENWOOD, B; LUSINGU, J; GESASE, S; MALABEJA, A; ABDUL, O; KILAVO, H; MAHENDE, C; LIHELUKA, E; LEMNGE, M; THEANDER, T; DRAKELEY, C; ANSONG, D; AGBENYEGA, T; ADJEI, S; BOATENG, HO; RETTIG, T; BAWA, J; SYLVERKEN, J; SAMBIAN, D; AGYEKUM, A; OWUSU, L; MARTINSON, F; HOFFMAN, I; MVALO, T; KAMTHUNZI, P; NKOMO, R; MSIKA, A; JUMBE, A; CHOME, N; NYAKUIPA, D; CHINTEDZA, J; BALLOU, WR; BRULS, M; COHEN, J; GUERRA, Y; JONGERT, E; LAPIERRE, D; LEACH, A; LIEVENS, M; OFORI-ANYINAM, O; VEKEMANS, J; CARTER, T; LEBOULLEUX, D; LOUCQ, C; RADFORD, A; SAVARESE, B; SCHELLENBERG, D; SILLMAN, M; VANSADIA, P; RTS,S Clinical Trials Partnership. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *The New England journal of medicine*, v. 365, n. 20, p. 1863-1875, 2011.

AGNANDJI ST; LELL B; FERNANDES JF; ABOSSOLO BP; METHOGO BG; KABWENDE AL; ADEGNIKA AA; MORDMÜLLER B; ISSIFOU S; KREMSNER PG; SACARLAL J; AIDE P; LANASPA M; APONTE JJ, MACHEVO S, ACACIO S, BULO H, SIGAUQUE B, MACETE E, ALONSO P, ABDULLA S, SALIM N, MINJA R, MPINA M, AHMED S, ALI AM, MTORO AT, HAMAD AS, MUTANI P, TANNER M, TINTO H, D'ALESSANDRO U, SORGHO H, VALEA I, BIHOUN B, GUIRAUD I, KABORÉ B, SOMBIÉ O, GUIGUEMDÉ RT, OUÉDRAOGO JB, HAMEL MJ, KARIUKI S, ONEKO M, ODERO C, OTIENO K, AWINO N, MCMORROW M, MUTURI-KIOI V, LASERSON KF, SLUTSKER L, OTIENO W, OTIENO L, OTSYULA N, GONDI S,

OTIENO A, OWIRA V, OGUKE E, ODONGO G, WOODS JB, OGUTU B, NJUGUNA P, CHILENGI R, AKOO P, KERUBO C, MAINGI C, LANG T, OLOTU A, BEJON P, MARSH K, MWAMBINGU G, OWUSU-AGYEI S, ASANTE KP, OSEI-KWAKYE K, BOAHEN O, DOSOO D, ASANTE I, ADJEI G, KWARA E, CHANDRAMOHAN D, GREENWOOD B, LUSINGU J, GESASE S, MALABEJA A, ABDUL O, MAHENDE C, LIHELUKA E, MALLE L, LEMNGE M, THEANDER TG, DRAKELEY C, ANSONG D, AGBENYEGA T, ADJEI S, BOATENG HO, RETTIG T, BAWA J, SYLVERKEN J, SAMBIAN D, SARFO A, AGYEKUM A, MARTINSON F, HOFFMAN I, MVALO T, KAMTHUNZI P, NKOMO R, TEMBO T, TEGHA G, TSIDYA M, KILEMBE J, CHAWINGA C, BALLOU WR, COHEN J, GUERRA Y, JONGERT E, LAPIERRE D, LEACH A, LIEVENS M, OFORI-ANYINAM O, OLIVIER A, VEKEMANS J, CARTER T, KASLOW D, LEBOULLEUX D, LOUCQ C, RADFORD A, SAVARESE B, SCHELLENBERG D, SILLMAN M, VANSADIA P; RTS,S CLINICAL TRIALS PARTNERSHIP. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. *The New England Journal of Medicine*, v. 367, n. 24, p. 2284-2295, 2012.

AHMED, R.; GRAY, D. Immunological Memory and Protective Immunity: Understanding Their Relation. *Nature*, v. 272, n. 5258, p. 54-60, 1996.

AKPOGHENETA, O. J.; DUAH, N. O.; TETTEH, DUNYO, S.; LANAR, D. E.; PINDER, M.; CONWAY, D. J. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. *Infection and immunity*, v. 76, n. 4, p. 1748-1755, 2008.

ALVES, A.; MARTINS, A.; ADOLPHSSON, S.; BOCKORNY, B.; CARLETI, G.; CABRAL, G.; SOUZA, C. P.; VIANNA, A. Malária Grave Importada. Relato de Caso. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 19, n. 2, p. 232-236, 2007.

AMANNA, I. J.; CARLSON, N. E.; SLIFKA, M. K. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *New England Journal of Medicine*, v. 357, n. 19, p. 1903-1915, 2007.

AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K. Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. *Immunological reviews*, v. 236, n. 1, p. 125-138, 2010.

AMANTE, F. H.; GOOD, M. F. Prolonged Th1-like response generated by a *Plasmodium yoeli*-specific T cell clone allows complete clearance of infection in reconstituted mice. *Parasite Immunology*, v. 19, n. 3, p. 111-126, 1997.

AMARAL, L.C. Desenvolvimento de um protocolo de PCR em Tempo Real para diagnóstico de malária subpatente e infecções mistas por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Centro de Pesquisas René Rachou, CPqRR, Belo Horizonte.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MENARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*, v. 12, n. 2, p. 220-224, 2006.

AMPOMAH, P.; STEVENSON, L.; OFORI, M. F.; BARFOD, L.; HVIID, L. Kinetics of B Cell Responses to *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 in Ghanaian Women Naturally Exposed to Malaria Parasites. *The Journal of Immunology*, v. 192, n. 11, p. 5236-5244, 2014.

ANDERS, R. F.; CREWETHER, P. E.; EDWARDS, S.; MARGETTS, M.; MATTHEW, M. L.; POLLOCK, B.; PYE, D. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. *Vaccine*, v. 16, n. 2-3, p. 240-247, 1998.

ANSTEY, N. M.; DOUGLAS, N. M.; POESPOPRODJO, J. R.; PRICE, R. N. *Plasmodium vivax*: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Advances in Parasitology*, v. 80, p. 151-201, 2012.

ANOLIK, J. H.; LOONEY, R. J.; LUND, F. E.; RANDALL, T. D.; SANZ, I. Insights into the heterogeneity of human B cells: diverse functions, roles in autoimmunity, and use as therapeutic targets. *Immunologic research*, v. 45, n. 2-3, p. 144-158, 2009.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN- γ from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *The Journal of Immunology*, v. 169, n. 6, p. 2956-2963, 2002.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; TONGREN, J. E.; RILEY, E. M. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 133, n. 2, p. 145-152, 2003.

ASHLEY, E. A.; DHORDA, M.; FAIRHURST, R.M.; AMARATUNGA, C.; LIM, P.; SUON, S.; SRENG, S.; ANDERSON, J.M.; MAO, S.; SAM, B.; SOPHA, C.; CHUOR, C. M.; NGUON, C.; SOVANNAROTH, S.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; JITTAMALA, P.; CHOTIVANICH, K.; CHUTASMIT, K.; SUCHATSOONTHORN, C.; RUNCHAROEN, R.; HIEN, T. T.; THUY-NHIEN, N. T.; THANH, N. V.; PHU, N. H.; HTUT, Y.; HAN, K. T.; AYE, K. H.; MOKUOLU, O.A.; OLAOSEBIKAN, R. R.; FOLARANMI, O.O.; MAYXAY, M.; KHANTHAVONG, M.; HONGVANTHONG, B.; NEWTON, P. N.; ONYAMBOKO, M. A.; FANELLO, C. I.; TSHEFU, A. K.; MISHRA, N.; VALECHA, N.; PHYO, A. P.; NOSTEN, F.; YI, P.; TRIPURA, R.; BORRMANN, S.; BASHRAHEIL, M.; PESHU, J.; FAIZ, M. A.; GHOSE, A.; HOSSAIN, M. A.; SAMAD, R.; RAHMAN, M. R.; HASAN, M. M.; ISLAM, A.; MIOTTO, O.; AMATO, R.; MACINNIS, B.; STALKER, J.; KWIATKOWSKI, D. P.; BOZDECH, Z.; JEEYAPANT, A.; CHEAH, P. Y.; SAKULTHAEW, T.; CHALK, J.; INTHARABUT, B.; SILAMUT, K.; LEE, S. J.; VIHOKHERN, B.; KUNASOL, C.; IMWONG, M.; TARNING, J.; TAYLOR, W. J.; YEUNG, S.; WOODROW, C.J.; FLEGG, J. A.; DAS, D.; SMITH, J.; VENKATESAN, M.; PLOWE, C.V.; STEPNIIEWSKA, K.; GUERIN, P.J.; DONDORP, A. M.; DAY, N.P.; WHITE, N. J. Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *The New England Journal of Medicine*, v. 371, n. 5, p. 411-423, 2014.

ASITO, A. S.; MOORMANN, A. M.; KIPROTICH, C.; NG'ANG'A, Z. W.; PLOUTZ-SNYDER, R.; ROCHFORD, R. Alterations on peripheral B cell subsets following an acute uncomplicated clinical malaria infection in children. *Malaria journal*, v. 7, p. 238, 2008.

ASITO, A. S.; PIRIOU, E.; JURA, W. G. Z. O.; OUMA, C.; ODADA, O. S.; OGOLA, S.; FIORE, N.; ROCHFORD, R. Suppression of circulating IgD⁺CD27⁺ memory B cells in infants living in a malaria-endemic region of Kenya. *Malaria journal*, v. 10, p. 362, 2011.

AURRECOECHEA, C.; BRESTELLI, J.; BRUNK, B. P.; DOMMER, J.; FISCHER, S.; GAJRIA, B.; HEIGES, M. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. *Nucleic acids research*, v. 37, suppl 1, D539-D543, 2009.

AYIEKO, C.; MAUE, A. C.; JURA, W. G. Z. O.; NOLAND, G. S.; AYODO, G.; ROCHFORD, R.; JOHN, C. C. Changes in B Cell Populations and Merozoite Surface Protein-1-Specific Memory B Cell Responses after Prolonged Absence of Detectable *P. falciparum* Infection. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, e67230, 2013.

BAIRD, J. K. Age dependent characteristics of protection vs. susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Annals of tropical medicine and parasitology*, v. 92, n. 4, p. 367-390, 1998.

BARATA, R. C. B. Malaria in Brazil: trends in the last ten years. *Cadernos de saúde pública*, v. 11, n. 1, p. 128-136, 1995.

BARBEDO, M. B.; RICCI, R.; JIMENEZ, M. C.; CUNHA, M. G.; YAZDANI, S. S.; CHITNIS, C. E.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 3, p. 335-339, 2007.

BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R.; DESIMONE, S. G.; PERLER, F.; INGRAVALLO, P. *Plasmodium vivax*, *P. cynomolgi*, and *P. knowlesi*: Identification of Homologue Proteins Associated with the Surface of Merozoites. *Experimental Parasitology*, v. 91, n. 3, p. 238-249, 1999.

BARRY, A. E.; TRIEU, A.; FOWKES, F. J.; PABLO, J.; KALANTARI-DEHAGHI, M.; JASINSKAS, A.; TAN, X.; KAYALA, M. A.; TAVUL, L.; SIBA, P. M.; DAY, K. P.; BALDI P.; FELGNER P. L.; DOOLAN D. L. The stability and complexity of antibody responses to the major surface antigen of *Plasmodium falciparum* are associated with age in a malaria endemic area. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 10, n. 11, p. M111-008326, 2011.

BEESON, J. G.; OSIER, F. H.; ENGWERDA, C. R. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. *Trends in parasitology*, v. 24, n. 12, p. 578-584, 2008.

BEESON, J. G.; DREW, D. R.; BOYLE, M. J.; FENG, G.; FOWKES, F. J.; RICHARDS, J. S. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS microbiology reviews*, v. 40, n. 3, p. 343-372, 2016.

BEJON, P.; WHITE, M. T.; OLOTU, A.; BOJANG, K.; LUSINGU, J. P.; SALIM, N.; OTSYULA, N. N.; AGNANDJI, S. T.; ASANTE, K. P.; OWUSU-AGYEI, S.; ABDULLA, S.; GHANI, A.C. Efficacy of RTS,S malaria vaccines: individual-participant pooled

analysis of phase 2 data. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 13, n. 4, p. 319-327, 2013.

BERNASCONI, N. L.; ONAI, N.; LANZAVECCHIA, A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood*, v. 101, n. 11, p. 4500-4504, 2003.

BERNASCONI, N. L.; TRAGGIAI, E.; LANZAVECCHIA, A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*, v. 298, n. 5601, p. 2199-2202, 2002.

BETUELA, I.; ROSANAS-URGELL, A.; KINIBORO, B.; STANISIC, D. I.; SAMOL, L.; DE LAZZARI, E.; DEL PORTILLO, H. Á.; SIBA, P.; ALONSO, P. L.; BASSAT, Q.; MUELLER, I. Relapses contribute significantly to the risk of *Plasmodium vivax* infection and disease in Papua New Guinean children 1-5 years of age. *Journal of Infectious Diseases*, v. 206, n. 11, p. 1771-1780, 2012.

BISWAS, S.; SETH, R. K.; TYAGI, P. K.; SHARMA, S. K.; DASH, A. P. Naturally acquired immunity and reduced susceptibility to falciparum malaria in two subpopulations of endemic eastern India. *Scandinavian journal of immunology*, v. 67, n. 2, p. 177-184, 2008.

BLAIR, P. A.; NOREÑA, L. Y.; FLORES-BORJA, F.; RAWLINGS, D. J.; ISENBERG, D. A.; EHRENSTEIN, M. R.; MAURI, C. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity*, v. 32, n. 1, p. 129-140, 2010.

BLEDSON, G. H. Malaria primer for clinicians in the United States. *Southern medical journal*, v. 98, n. 12, p. 1197-1204, 2005.

BOHNHORST, J. O.; BJORGAN, M. B.; THOEN, J. E.; NATVIG, J. B.; THOMPSON, K. M. Bm1–Bm5 Classification of Peripheral Blood B Cells Reveals Circulating Germinal Center Founder Cells in Healthy Individuals and Disturbance in the B Cell Subpopulations in Patients with Primary Sjögren's Syndrome. *The Journal of Immunology*, v. 167, n. 7, p. 3610-3618, 2001.

BORHIS, G.; RICHARDS, Y. Subversion of the B-cell compartment during parasitic, bacterial, and viral infections. *BMC Immunology*, v. 16, p. 15, 2015.

BOUHAROUN-TAYOUN, H.; OEUVRAY, C.; LUNEL, F.; DRUILHE, P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Journal of Experimental Medicine*, v. 182, n. 2, p. 409-418, 1995.

BOUSEMA, T.; GRIFFIN, J. T.; SAUERWEIN, R. W.; SMITH, D. L.; CHURCHER, T. S.; TAKKEN, W.; GHANI, A.; DRAKELEY, C.; GOSLING, R. Hitting hotspots: spatial targeting of malaria for control and elimination. *PLoS Med*, v. 9, n. 1, p. e1001165, 2012.

BOYLE, M. J.; REILING, L.; FENG, G.; LANGER, C.; OSIER, F. H.; ASPELING-JONES, H.; CHENG, Y. S.; STUBBS, J.; TETTEH, K. K.; CONWAY, D. J.; MCCARTHY, J. S.; MULLER, I.; MARSH, K.; ANDERS, R. F.; BEESON, J. G. Human antibodies fix complement to inhibit *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. *Immunity*, v. 42, n. 3, p. 580-590, 2015.

BOYLE, M. J.; REILING, L.; OSIER, F. H.; FOWKES, F. J. Recent insights into humoral immunity targeting *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. *International journal for parasitology*, v. 47, n. 2-3, p. 99-104, 2016.

BRAKE, D. A.; LONG, C. A.; WEIDANZ, W. P. Adoptive protection against *Plasmodium chabaudi* adami malaria in athymic nude mice by a cloned T cell line. *The Journal of immunology*, v. 140, n. 6, p. 1989-1993, 1988.

BRASIL-MS. Guia de Vigilância em Saúde, 2014. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2014.

BRASIL-MS. Brasil tem o menor número de casos de malária dos últimos 35 anos. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/04/brasil-tem-o-menor-numero-de-casos-de-malaria-dos-ultimos-35-anos>>. Acesso em: 16 fev. 2017.

BROWN, M.; WITTEWER, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical chemistry*, v. 46, n. 8, p. 1221-1229, 2000.

BRUCE-CHWATT, L. J. *Essential malariology*. 2. ed. Londres: William Heineman, 1985.

BUENO, L. L.; LOBO, F. P.; MORAIS, C. G.; MOURÃO, L. C.; DE ÁVILA, R. A.; SOARES, I. S.; FONTES, C. J.; LACERDA, M. V.; OLORTEGUI, C.C.; BARTHOLOMEU, D. C.; FUJIWARA, R. T.; BRAGA, É. M. Identification of a highly antigenic linear B cell epitope within *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1). *PLoS One*, v. 6, n. 6, e21289, 2011.

BUISMAN, A. M.; DE ROND, C. G. H.; ÖZTÜRK, K.; TEN HULSCHER, H. I.; VAN BINNENDIJK, R. S. Long-term presence of memory B-cells specific for different vaccine components. *Vaccine*, v. 28, p. 179-186, 2009.

BULL, P. C.; LOWE, B. S.; KORTOK, M.; MOLYNEUX, C. S.; NEWBOLD, C. I.; MARSH, K. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nature medicine*, v. 4, n. 3, p. 358, 1998.

CAO, Y.; GORDIC, M.; KOBOLD, S.; LAJMI, N.; MEYER, S.; BARTELS, K.; BOKEMEYER, C. An optimized assay for the enumeration of antigen-specific memory B cells in different compartments of the human body. *Journal of immunological methods*, v. 358, p. 56-65, 2010.

CARLTON, J. M.; ADAMS, J. H.; SILVA, J. C.; BIDWELL, S. L.; LORENZI, H.; CALER, E.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S. V.; MERINO, E. F.; AMEDEO, P.; CHENG, Q.; COULSON, R. M. R.; CRABB, B. S.; DEL PORTILLO, H. Á.; ESSIEN,

K.; FELDBLYUM, T. V.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; GILSON, P. R.; GUEYE, A. H.; GUO, X.; KANG'A, S.; KOOIJ, T. W. A.; KORSINCZKY, M.; MEYER, E. V. S.; NENE, V.; PAULSEN, I.; WHITE, O.; RALPH, A. S.; REN, Q. H.; SARGEANT, T. J.; SALZBERG, S. L.; STOECKERT, C. J.; SULLIVAN, A. S.; YAMAMOTO, M. M.; HOFFMAN, S. L.; WORTMAN, J. R.; GARDNER, M. J.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; FRASER-LIGGETT, C. M. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*, v. 455, n. 7214, p. 757-763. 2008.

CARLTON, J. M.; SINA, B. J.; ADAMS, J. H. Why is *Plasmodium vivax* a neglected tropical disease?. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 5, n. 6, e1160, 2011.

CARROLO, M.; GIORDANO, S.; CABRITA-SANTOS, L.; CORSO, S.; VIGÁRIO, A. M.; SILVA, S.; LEIRIÃO, P.; CARAPAU, D.; ARMAS-PORTELA, R.; COMOGLIO, P. M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nature Medicine*, v. 9, n. 11, p. 1363-1369, 2003.

CATELAN, T. T. T.; MESQUITA JR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; SILVA DE SOUZA, A. W.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P.; CRUVINEL, W. M. Linfócitos B: da imunobiologia aos imunobiológicos. *Sinopse de Reumatologia*, v. 10, p. 35-57, 2008.

CAVASINI, C.E.; MATTOS, L.C.; COUTO, A.A.; BONINI-DOMINGOS, C.R.; VALENCIA, S.H.; NEIRAS, W.C.; ALVES, R.T.; ROSSIT, A.R.; CASTILHO, L.; MACHADO, R.L. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 101, p. 1042-1044, 2007.

CERAVOLO, I. P.; SANCHEZ, B. A. M.; SOUSA, T. N.; GUERRA, B. M.; SOARES, I. S.; BRAGA, E. M.; MCHENRY, A. M.; ADAMS, J. H.; BRITO, C. F.; CARVALHO, L. H. Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 156, n. 3, p. 502-510, 2009.

CESBRON-DELAUW, M. F.; GENDRIN, C.; TRAVIER, L.; RUFFIOT, P.; MERCIER, C. Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. *Traffic*, v. 9, n. 5, p. 657-664, 2008.

CHAN, J. A.; FOWKES, F. J.; BEESON, J. G. Surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 71, n. 19, p. 3633-3657, 2014.

CHARLES, E. D.; GREEN, R. M.; MARUKIAN, S.; TALAL, A. H.; LAKE-BAKAAR, G. V.; JACOBSON, I. M.; DUSTIN, L. B. Clonal expansion of immunoglobulin M⁺ CD27⁺ B cells in HCV-associated mixed cryoglobulinemia. *Blood*, v. 111, n. 3, p. 1344-1356, 2008.

CHESNE-SECK, M. L.; PIZARRO, J. C.; VULLIEZ-LE NORMAND, B.; COLLINS, C. R.; BLACKMAN, M. J.; FABER, B. W.; REMARQUE, E. J.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BENTLEY, G. A. Structural comparison of apical membrane

antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 144, n. 1, p. 55-67, 2005.

CHIA, W. N.; GOH, Y. S.; RÉNIA, L. Novel approaches to identify protective malaria vaccine candidates. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 586, 2014.

CLARK, E. H.; SILVA, C. J.; WEISS, G. E.; LI, S.; PADILLA, C.; CROMPTON, P. D.; HERNANDEZ, J. N.; BRANCH, O. H. *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory. *Infection and immunity*, v. 80, n. 4, p. 1583–1592, 2012.

COBAN, C.; ISHII, K. J.; KAWAI, T.; HEMMI, H.; SATO, S.; UEMATSU, S.; AKIRA, S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *The Journal of experimental medicine*, v. 201, n. 1, p. 19-25, 2005.

COBAN, C.; ISHII, K. J.; HORII, T.; AKIRA, S. Manipulation of host innate immune responses by the malaria parasite. *Trends in parasitology*, v. 15, n. 6, p. 271-278, 2007.

COHEN, S.; MCGREGOR, I. A.; CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*, v. 192, p. 733-737, 1961.

COX-SINGH, J.; DAVIS, T. M.; LEE, K. S.; SHAMSUL, S. S.; MATUSOP, A.; RATNAM, S.; RAHMAN, H. A.; CONWAY, D. J.; SINGH, B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical infectious diseases*, v. 46, n. 2, p. 165-171, 2008.

COX-SINGH, J.; SING, B. *Knowlesi* malaria: newly emergent and of public health importance?. *Trends in parasitology*, v. 24, n. 9, p. 406-410, 2008.

CREWETHER, P. E.; MATTHEW, M. L.; FLEGG, R. H.; ANDERS, R. F. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. *Infection and immunity*, v. 64, n. 8, p. 3310-3317, 1996.

CROMPTON, P. D.; TRAORE, B.; KAYENTAO, K.; DOUMBO, S.; ONGOIBA, A.; DIAKITE, S. A.; KRAUSE, M. A.; DOUMTABE, D.; KONE, Y.; WEISS, G.; HUANG, C. Y.; DOUMBIA, S.; GUINDO, A.; FAIRHURST, R. M.; MILLER, L. H.; PIERCE, S. K.; DOUMBO, O. K. Sick cell trait is associated with a delayed onset of malaria: implications for time-to-event analysis in clinical studies of malaria. *The Journal of infectious diseases*, v. 198, n. 9, p. 1265-1275, 2008.

CROMPTON, P. D.; MIRCETIC, M.; WEISS, G.; BAUGHMAN, A.; HUANG, C. Y.; TOPHAM, D. J.; TREANOR, J. J.; SANZ, I.; LEE, F. E.; DURBIN, A. P.; MIURA, K.; NARUM, D. L.; ELLIS, R. D.; MALKIN, E.; MULLEN, G. E.; MILLER, L. H.; MARTIN, L. B.; PIERCE, S. K. The TLR9 ligand CpG promotes the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in malaria-naive individuals. *The Journal of Immunology*, v. 182, n. 5, p. 3318–3326, 2009.

CROMPTON, P. D.; PIERCE, S. K.; MILLER, L. H. Advances and challenges in malaria vaccine development. *The Journal of clinical investigation*, v. 120, n. 12, p. 4168-4178, 2010.

CROTTY, S.; FELGNER, P.; DAVIES, H.; GLIDEWELL, J.; VILLARREAL, L., AHMED, R. Cuttingedge: long-term B cell memory in humans after small poxvaccination. *The Journal of Immunology*, v. 171, p. 4969–4973, 2003.

CROTTY, S.; AUBERT, R. D.; GLIDEWELL, J.; AHMED, R. Tracking human antigen specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. *Journal of immunological methods*, v. 286, n. (1-2), p. 111–122, 2004.

CZERKINSKY, C. C.; NILSSON, L. A.; NYGREN, H.; OUCHTERLONY, O.; TARKOWSKI A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 109-121, 1983.

DANIEL-RIBEIRO, C. T.; ZANINI, G. Autoimmunity and malaria: what are they doing together? *Acta Tropica*, v. 76, n. 3, p. 205–221, 2000.

DE PINA-COSTA, A., BRASIL, P., DI SANTI, S. M., DE ARAUJO, M. P., SUÁREZ-MUTIS, M. C., SANTELLI, A. C., OLIVEIRA-FERREIRA, J., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R., DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 5, p. 618-33, 2014.

DEANS, J. A.; KNIGHT, A. M.; JEAN, W. C.; WATERS, A. P.; COHEN, S.; MITCHELL, G. H. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. *Parasite immunology*, v. 10, n. 5, p. 535-552, 1988.

DEMAS, A.; OBERSTALLER, J.; DEBARRY, J.; LUCCHI, N. W.; SRINIVASAMOORTHY, G.; SUMARI, D.; KABANYWANYI, A.M.; VILLEGAS, L.; ESCALANTE, A. A.; KACHUR, S. P.; BARNWELL, J. W.; PETERSON, D. S.; UDHAYAKUMAR, V.; KISSINGER J. C. Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *Journal of clinical microbiology*, v. 49, n. 7, p. 2411-2418, 2011.

DIAS, S.; SOMARATHNA, M.; MANAMPERI, A.; ESCALANTE, A. A.; GUNASEKERA, A. M.; UDAGAMA, P. V. Evaluation of the genetic diversity of domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA-1) and the ensuing strain-specific immune responses in patients from Sri Lanka. *Vaccine*, v. 29, n. 43, p. 7491-7504, 2011.

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired immunity to malaria. *Clinical microbiology reviews*, v. 22, n. 1, p. 13-36, 2009.

DORFMAN, J. R.; BEJON, P.; NDUNGU, F. M.; LANGHORNE, J.; KORTOK, M. M.; LOWE, B. S.; MWANGI, T. W.; WILLIAMS, T. N.; MARSH, K. B cell memory to 3

Plasmodium falciparum blood-stage antigens in a malaria-endemic area. *Journal of Infectious Diseases*, v. 191, n. 10, p. 1623-1630, 2005.

DRUILHE, P.; KHUSMITH, S. Epidemiological correlation between levels of antibodies promoting merozoite phagocytosis of *Plasmodium falciparum* and malaria-immune status. *Infection and immunity*, v. 55, n. 4, p. 888-891, 1987.

DRUILHE, P.; BARNWELL, J. W. Pre-erythrocytic stage malaria vaccines: time for a change in path. *Current Opinion in Microbiology*, v. 10, n. 4, p. 371–378, 2007.

DUPS, J. N.; PEPPER, M.; COCKBURN, I. A. Antibody and B cell responses to *Plasmodium* sporozoites, 2014.

DUTTA, S.; HAYNES, J. D.; MOCH, J. K.; BARBOSA, A.; LANAR, D. E. Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 21, p. 12295-12300, 2003.

DYER, M.; DAY, K. P. Commitment to Gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology*, v. 16, n. 3, p. 102-107, 2000.

EHRHARDT, G. R. A.; HSU, J. T.; GARTLAND, L.; LEU, C. M.; ZHANG, S.; DAVIS, R. S.; COOPER, M. D. Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 202, n. 6, p. 783-791, 2005.

ELLIOT, S. R.; BRENNAN, A. K.; BEESON, J. G. Placental malaria induces variant antibody of the cytophlyic subtype immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 that correlate with adhesion inhibitory activity. *Infection and immunity*, v. 73, n. 9, p. 5903-5907, 2005.

ENGWERDA, A.; C. R.; MINIGO, G.; AMANTE, F. H.; MCCARTHY, J. S. Experimentally induced blood stage malaria infection as a tool for clinical research. *Cell press*, v. 28, n. 11, p. 515-521, 2012.

FELL, A. H.; CURRIER, J.; GOOD, M. F. Inhibition of *Plasmodium falciparum* growth *in vitro* by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from non-exposed donors. *Parasite Immunology*, v. 16, n. 11, p. 579–586, 1994.

FELL, A. H.; SMITH, N. C. Immunity to asexual blood stages of *Plasmodium*: is resistance to acute malaria adaptive or innate? *Parasitology Today*, v. 14, n. 9, p. 364-369, 1998.

FENG, Z. P.; KEIZER, D. W.; STEVENSON, R. A.; YAO, S.; BABON, J. J.; MURPHY, V. J.; ANDERS, R. F.; NORTON, R. S. Structure and inter-domain interactions of domain II from the blood-stage malarial protein, apical membrane antigen 1. *Journal of molecular biology*, v. 350, n. 4, p. 641-656, 2005.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malaria journal*, v. 15, n. 1, p. 284, 2016.

FESEL, C.; GOULART, L. F.; NETO, A. S.; COELHO, A.; FONTES, C. J. F.; BRAGA, E. M.; VAZ, N. M. Increased polyclonal immunoglobulin reactivity toward human and bacterial proteins is associated with clinical protection in human *Plasmodium infection*. *Malaria journal*, v. 4, p. 5, 2005.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FRANÇA, C. T.; HE, W. Q.; GRUSZCZYK, J.; LIM, N. T.; LIN, E.; KINIBORO, B.; SIBA, P. M.; THAM, W. H.; MUELLER, I. *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins Are Key Targets of Naturally Acquired Immunity in Young Papua New Guinean Children. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 10, n. 9, e0005014, 2016.

FRASER, T. S.; KAPPE, S. H.; NARUM, D. L.; VANBUSKIRK, K. M.; ADAMS, J. H. Erythrocyte-binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 117, n. 1, p. 49-59, 2001.

FROSCH, A. E. P.; JONH, C. C. Immunomodulation in *Plasmodium falciparum* malaria: experiments in nature and their conflicting implications for potential therapeutic agents. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 10, n. 11, p. 1343-1356, 2012.

GONÇALVES, R. M.; SCOPEL, K. K.; BASTOS, M. S.; FERREIRA, M. U. Cytokine balance in human malaria: does *Plasmodium vivax* elicit more inflammatory responses than *Plasmodium falciparum*? *PLoS One*, v. 7, n. 9, e44394, 2012.

GOOD, M. F.; KASLOW, D. C.; MILLER, L. H. Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annual review of immunology*, v. 16, p. 57-87, 1998.

GOOD, M. F. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends Parasitology*, v. 21, n. 1, p. 29-34, 2005.

GOOD-JACOBSON, K. L.; SHLOMCHIK, M. J. Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *The Journal of Immunology*, v. 185, n. 6, p. 3117-3125, 2010.

GORDEN, K. K.; QIU, X.; BATTISTE, J. J.; WIGHTMAN, P. P.; VASILAKOS, J. P.; ALKAN, S. S. Oligodeoxynucleotides differentially modulate activation of TLR7 and TLR8 by imidazoquinolines. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 11, p. 8164-8170, 2006.

GRUN, J. L.; WEIDANZ, W. P. Antibody-independent immunity to reinfection malaria in B-cell-deficient mice. *Infection and immunity*, v. 41, n. 3, p. 1197-1204, 1983.

GRÜRING, C.; HEIBER, A.; KRUSE, F.; UNGEFEHR, J.; GILBERGER, T. W.; SPIELMANN, T. Development and host cell modifications of *Plasmodium falciparum* blood stages in four dimensions. *Nature communications*, v. 2, p. 165, 2011.

GUEIRARD, P. J.; TAVARES, S.; THIBERGE, F.; BERNEX, T.; ISHNO, G.; MILON, B.; FRANKE-FAYARD, C. J.; JANSE, R.; MÉNARD, R.; AMINO, R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 43, p. 18640-18645, 2010.

HAGA, C. L.; EHRHARDT, G. R.; BOOHAKER, R. J.; DAVIS, R. S.; COOPER, M. D. Fc receptor-like 5 inhibits B cell activation via SHP-1 tyrosine phosphatase recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 23, p. 9770-9775, 2007.

HANS, D.; PATTNAIK, P.; BHATTACHARYYA, A.; SHAKRI, A. R.; YAZDANI, S. S.; SHARMA, M.; CHOE, H.; FARZAN, M.; CHITNIS, C.E. Mapping binding residues in the *Plasmodium vivax* domain that binds Duffy antigen during red cell invasion. *Molecular Microbiology*, v. 55, n. 5, p. 1423-1434, 2005.

HARTY, J. T.; TVINNEREIM, A. R.; WHITE, D. W. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual review of immunology*, v. 18, n. 1, p. 275-308, 2000.

HARWOOD, N. E.; BATISTA, F. D. Antigen presentation to B cells. *F1000 reports biology*, v. 2, p. 87, 2010.

HELMBY, H.; JÖNSSON, G.; TROYE-BLOMBERG, M. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infection and immunity*, v. 68, n. 3, p. 1485-1490, 2000.

HERRERA, S.; BONELO, A.; PERLAZA, B. L.; VALENCIA, A. Z.; CIFUENTES, C.; HURTADO, S.; QUINTERO, G.; LÓPEZ, J. A.; CORRADIN, G.; ARÉVALO-HERRERA, M. Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *International journal for parasitology*, v. 34, n. 13, p. 1535-1546, 2004.

HERRINGTON, D. A.; CLYDE, D. F.; LOSONSKY, G.; CORTESIA, M.; MURPHY, J. R.; DAVIS, J.; BAQAR, S. FELIX, A. M.; HEIMER, E. P.; GILLESSEN, D.; et al. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature*, v. 328, n. 6127, p. 257-259, 1987.

HISAEDA, H., HAMANO, S., MITOMA-OBATA, C., TETSUTANI, K., IMAI, T., WALDMANN, H., HIMENO, K., YASUTOMO, K. Resistance of regulatory T cells to glucocorticoid-induced [corrected] TNFR family-related protein (GITR) during *Plasmodium yoelii* infection. *European journal of immunology*, v. 35, n. 12, p. 3516-3524, 2005.

HODDER, A. N.; CREWETHER, P. E.; MATTHEW, M. L.; REID, G. E.; MORITZ, R. L.; SIMPSON, R. J.; ANDERS, R. F. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, n. 46, p. 29446-29452, 1996.

HOWES, R. E.; BATTLE, K. E.; MENDIS, K. N.; SMITH, D. L.; CIBULSKIS, R. E.; BAIRD, J. K.; HAY, S. I. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 95, n. 6, p. 15-34, 2016.

HVIID, L.; BARFOD, L.; FOWKES, F. J. Trying to remember: immunological B cell memory to malaria. Trends in Parasitology, v. 31, n. 3, p. 89–94, 2015.

HVIID, L.; KEMP, K. What Is the Cause of Lymphopenia in Malaria? Infection and immunity, v. 68, n. 10, p. 6087-6089, 2000.

ILLINGWORTH, J.; BUTLER, N. S.; ROETYNCK, S.; MWACHARO, J.; PIERCE, S. K.; BEJON, P.; CROMPTON, P. D.; MARSH, K.; NDUNGU, F. M. Chronic Exposure to *Plasmodium falciparum* Is Associated with Phenotypic Evidence of Band T Cell Exhaustion. The Journal of Immunology, v. 190, n. 3, p. 1038-1047, 2013.

IMAI, T.; SHEN, J.; CHOU, B.; DUAN, X.; TU, L.; TETSUTANI, K.; MORIYA, C.; ISHIDA, H.; HAMANO, S.; SHIMOKAWA, C.; HISAEDA, H.; HIMENO, K. Involvement of CD8⁺ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17XL strain. European journal of immunology, v. 40, n. 4, p. 1053-1061, 2010.

ISET, V. M.; WANDY, B. L.; SINNIS, P.; KAMI, K. *Plasmodium* protease ROM1 is important for proper formation of parasitophorous vacuole. PLoS Pathogens, v. 7, n. 9, e1002197, 2011.

JAHNMATZ, M.; KESA, G.; NETTERLID, E.; BUISMAN, A. M.; THORSTENSSON, R.; AHLBORG, N. Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. Journal of immunological methods, v. 391, n. (1-2), p. 50–59, 2013.

JANETZKI, S.; PRICE, L.; SCHROEDER, H.; BRITTEN, C. M.; WELTERS, M. J.; HOOS, A. Guidelines for the automated evaluation of Elispot assays. Nature protocols, v. 10, n. 7, p. 1098-1115, 2015.

JONGWUTIWES, S.; PUTAPORNTIP, C.; IWASAKI, T.; SATA, T.; KANBARA, H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. Emerging infectious diseases, v. 10, n. 12, p. 2211-2213, 2004.

KADDUMUKASA, M.; LWANIRA, C.; LUGAAJU, A.; KATABIRA, E.; PERSSON, K. E.; WAHLGREN, M.; KIRONDE, F. Parasite Specific Antibody Increase Induced by an Episode of Acute *P. falciparum* Uncomplicated Malaria. PloS one, v. 10, n. 4, p. e0124297, 2015.

KAMINSKI, D. A.; WEI, C.; QIAN, Y.; ROSENBERG, A. F.; SANZ, I. Advances in human B cell phenotypic profiling. Frontiers in immunology, v. 3, p. 302, 2012.

KAPPE, S. H. I.; VAUGHAN, A. M.; BODDEY, J. A.; COWMAN, A. F. That was then but this is now: Malaria research in the time of an eradication agenda. Science, v. 328, n. 5980, p. 862-866, 2010.

KINYANJUI, S. M.; CONWAY, D. J.; LANAR, D. E.; MARSH, K. IgG antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. *Malaria journal*, v. 6, p. 82, 2007.

KLEIN, U.; RAJEWSKY, K.; KÜPPERS, R. Human immunoglobulin (Ig)M⁺ IgD⁺ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *The Journal of experimental medicine*, v. 188, n. 9, p. 1679-1689, 1998.

KOCKEN, C. H.; NARUM, D. L.; MASSOUGBODJI, A.; AYIVI, B.; DUBBELD, M. A.; VAN DER WEL, A.; CONWAY, D. J. SANNI, A.; THOMAS, A. W. Molecular characterisation of *Plasmodium reichenowi* apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with *P. falciparum* AMA-1, and antibody-mediated inhibition of red cell invasion. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 109, n. 2, p. 147-156, 2000.

KOCKEN, C. H.; WITHERS-MARTINEZ, C.; DUBBELD, M. A.; VAN DER WEL, A.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M. J.; THOMAS, A. W. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. *Infection and immunity*, v. 70, n. 8, p. 4471-4476, 2002.

KRISHNEGOWDA, G.; HAJJAR, A. M.; ZHU, J.; DOUGLASS, E. J.; UEMATSU, S.; AKIRA, S.; WOODS, A. S.; GOWDA, D. C. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 9, p. 8606-8616, 2005.

KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite a new theory of malaria relapse. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 79, n. 1, p. 1-11, 1985.

KUROSAKI, T. Regulation of BCR signaling. *Molecular Immunology*, v. 48, n. 11, 1287-1291, 2011.

KUROSAKI, T.; KOMETANI, K.; ISE, W. "Memory B cells". *Nature reviews*, v. 15, N. 3, p. 149-159, 2015.

KUSHWAHA, A.; RAO, P. P.; CHAUHAN, V. S. Immunogenicity of recombinant fragments of *Plasmodium falciparum* acidic basic repeat antigen produced in *Escherichia coli*. *Parasite immunology*, v. 23, n. 8, p. 435-444, 2001.

LACERDA, M. V. G.; MOURÃO, M. P. G.; ALEXANDRE, M. A. A.; SIQUEIRA, A. M.; MAGALHÃES, B. L. M.; MARTINEZ-ESPINOSA, F. E.; FILHO, F. S. S.; BRASIL, P.; VENTURA, A. M. R. S.; TADA, M. S.; COUTO, V. S. C. D.; SILVA, A. R.; SILVA, R. S. U.; ALECRIM, M. G. C. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malaria journal*, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2012.

LALITHA, P. V.; WARE, L. A.; BARBOSA, A.; DUTTA, S.; MOCH, J. K.; HAYNES, J. D.; FILETA, B. B.; WHITE, C. E.; LANAR, D. E. Production of the subdomains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 ectodomain and analysis of the immune response. *Infection and immunity*, v. 72, n. 8, p. 4464-4470, 2004.

LANDOLT-MARTICORENA, C.; WITHER, R.; REICH, H.; HERZENBERG, A.; SCHOLEY, J.; GLADMAN, D. D.; UROWITZ, M. B.; FORTIN, P. R.; WITHER, J. Increased Expression of B Cell Activation Factor Supports the Abnormal Expansion of Transitional B Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of rheumatology*, v. 38, n. 4, p. 642-651, 2011.

LANGHORNE, J., ALBANO, F. R., HENSMANN, M., SANNI, L., CADMAN, E., VOISINE, C., SPONAAS, A. M. Dendritic cells, pro-inflammatory responses, and antigen presentation in a rodent malaria infection. *Immunological reviews*, v. 201, p. 35-47, 2004.

LANGHORNE, J.; NDUNGU, F. M.; SPONAAS, A. M.; MARSH, K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature immunology*, v. 9, n. 7, p. 725-732, 2008.

LANZAVECCHIA, A.; BERNASCONI, N.; TRAGGIAI, E.; RUPRECHT, C. R.; CORTI, D.; SALLUSTO, F. Understanding and making use of human memory B cells. *Immunological Reviews*, v. 211, p. 303-309, 2006.

LIMA-JUNIOR, J. C.; TRAN, T. M.; MEYER, E. V. S.; SINGH, B.; DE-SIMONE, S. G.; SANTOS, F.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; MORENO, A.; BARNWELL, J.W.; GALINSKI, M. R.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals. *Vaccine*, v. 26, n. 51, p. 6645-6654, 2008.

LIMA-JUNIOR, J. C.; RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; BANIC, D. M.; JIANG, J.; SINGH, B.; FABRICIO-SILVA, G. M.; PORTO, L. C.; MEYER, E. V.; MORENO, A.; RODRIGUES, M. M.; BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R.; DE OLIVEIRA-FERREIRA, J. Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles on IgG antibody response to the *P. vivax* MSP-1, MSP-3 α and MSP-9 in individuals from Brazilian endemic area. *PloS one*, v. 7, n. 5, e36419, 2012.

LIMA, N. F. Métodos moleculares para detecção e quantificação de gametócitos de *Plasmodium*. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em biologia da relação patógeno-hospedeiro) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIU, X. Q.; STACEY, K. J.; HORNE-DEBETS, J. M.; CRIDLAND, J. A.; FISCHER, K.; NARUM, D.; MACKAY, F.; PIERCE, S. K. Malaria infection alters the expression of B-cell activating factor resulting in diminished memory antibody responses and survival. *European journal of immunology*, v. 42, n. 12, p. 3291-3301, 2012.

LOPERA-MESA, T. M.; KUSHWAHA, A.; MOHMMED, A.; CHAUHAN, V. S. *Plasmodium berghei* merozoite surface protein-9: immunogenicity and protective efficacy using a homologous challenge model. *Vaccine*, v. 26, n. 10, p. 1335-1343, 2008.

LUDER, C. G.; GROSS, U.; LOPES, M. F. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite–host interactions. *Trends in parasitology*, v. 17, n. 10, p. 480-486, 2001.

LUGAAJUU, A.; REDDY, S. B.; RÖNNBERG, C.; WAHLGREN, M.; KIRONDE, F.; PERSSON, K. E. Novel flow cytometry technique for detection of *Plasmodium falciparum* specific B-cells in humans: increased levels of specific B-cells in ongoing infection. *Malaria journal*, v. 14, n. 1, p. 370, 2015.

LUNDIE, R. J.; KONING-WARD, T. F.; DAVEY, G. M.; NIE, C. Q.; HANSEN, D. S.; LAU, L. S.; MINTERN, J. D.; BELZ, G. T.; SCHOFIELD, L.; CARBONE, F. R.; VILLADANGOS, J. A.; CRABB, B. S.; HEATH, W. R. Blood-stage *Plasmodium* infection induces CD8⁺ T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8 α ⁺ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 38, p. 14509–14514, 2008.

LUNEL, F.; DRUILHE, P. Effector cells involved in nonspecific and antibody-dependent mechanisms directed against *Plasmodium falciparum* blood stages *in vitro*. *Infection and immunity*, v. 57, n. 7, p. 2043-2049, 1989.

MAHAR, D. J. Frontier development policy in Brazil: a study of Amazonia. Praeger, 1979.

MALASPINA, A.; MOIR, S.; CHAITT, D. G.; REHM, C. A.; KOTTILIL, S.; FALLOON, J.; FAUCI, A. S. Idiopathic CD4⁺ T lymphocytopenia is associated with increases in immature/transitional B cells and serum levels of IL-7. *Blood*, v. 109, n. 5, p. 2086-2088, 2007.

MALES, S.; GAYE, O.; GARCIA, A. Long-Term Asymptomatic Carriage of *Plasmodium falciparum* Protects from Malaria Attacks: a Prospective Study among Senegalese Children. *Clinical infectious diseases*, v. 46, n. 4, p. 516-522, 2008.

MANNOOR, K.; LI C.; INAFUKU, M.; TANIGUCHI, T.; ABO, T.; SATO, Y.; WATANABE, H. Induction of ssDNA-binding autoantibody secreting B cell immunity during murine malaria infection is a critical part of the protective immune responses. *Immunobiology*, v. 218, n. 1, p. 10-20, 2013.

MARQUES, A. C. Migration and the dissemination of malaria in Brazil. *International Symposium on Malaria. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 81, p. 17-30, 1986.

MÉNARD, D.; BARNADAS, C.; BOUCHIER, C.; HENRY-HALLDIN, C.; GRAY, L. R.; RATSIMBASOA, A.; THONIER, V.; CAROD, J. F.; DOMARLE, O.; COLIN, Y.; BERTRAND, O.; PICOT, J.; KING, C. L.; GRIMBERG, B. T.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; ZIMMERMAN, P. A. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, p. 5967-5971, 2010.

MENDIS, K.; SINA, B. J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 64, n. 1-2 suppl, p. 97-106, 2001.

MIGOT, F.; CHOUGNET, C.; HENZEL, D.; DUBOIS, B.; JAMBOU, R.; FIEVET, N.; DELORON, P. Anti-malaria antibody-producing B cell frequencies in adults after a *Plasmodium falciparum* outbreak in Madagascar. Clinical & Experimental Immunology, v. 102, n. 3, p. 529-534, 1995.

MILLER, L. H.; MASON, S. J.; DVORAK, J. A.; MCGINNISS, M. H.; ROTHMAN I. K. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. Science, v. 189, p. 561-563, 1975.

MILLER, L. H.; MASON, S. J.; CLYDE, D. F.; MCGINNISS, M. H. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. The New England journal of medicine, v. 295, p. 302–304, 1976.

MILLER, L. H.; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUMBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. Nature, v. 415, p. 673-679, 2002.

MINGARI, M. C.; GEROSA, F.; CARRA, G.; ACCOLLA, R. S.; MORETTA, A.; ZUBLER, R. H.; WALDMANN TA; MORETTA L. Human interleukin-2 promotes proliferation of activated B cells via surface receptors similar to those of activated T cells. Nature, v. 312, n. 13, 1984.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2010. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf>. Acesso em: fev. 2017.

MITCHELL, G. H.; THOMAS, A. W.; MARGOS, G.; DLUZEWSKI, A. R.; BANNISTER, L. H. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. Infection and immunity, v. 72, n. 1, p. 154-158, 2004.

MOIR, S.; FAUCI, A. S. Insights into B cells and HIV-specific B-cell responses in HIV-infected individuals. Immunological reviews, v. 254, n. 1, p. 207–24, 2013.

MOIR, S.; HO, J.; MALASPINA, A; WANG, W.; DIPOTO, A.C.; O'SHEA, M.A.; et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. The Journal of experimental medicine, v. 205, n. 8, p. 1797–1805, 2008.

MOLNARFI, N.; BENKHOCHA, M.; FUNAKOSHI, H.; NAKAMURA, T.; LALIVE, P. H. Hepatocyte growth factor: a regulator of inflammation and autoimmunity. Autoimmunity reviews, v. 14, n. 4, p. 293-303, 2015.

MORAIS, C. G.; SOARES, I. S.; CARVALHO, L. H., FONTES, C. J.; KRETTLI, A. U.; BRAGA, E. M. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1:

persistence and correlation with malaria transmission intensity. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 75, n. 4, p. 582-587, 2006.

MOTA, M. M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J. P.; HAFALLA, J. C. R.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V.; RODRIGUEZ, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science*, v. 291, n. 5501, p. 141-144, 2001.

MUELLENBECK, M. F.; UEBERHEIDE, B.; AMULIC B.; EPP, A.; FENYO, D.; BUSSE, C. E.; ESEN, M.; THEISEN, M.; MORDMÜLLER, B.; WARDEMANN, H. Atypical and classical memory B cells produce *Plasmodium falciparum* neutralizing antibodies. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 210, n. 2, p. 389-399, 2013.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; KOCHAR, D. K.; ALONSO, P. L.; DEL PORTILLO, H. A. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet infectious diseases*, v. 9, n. 9, p. 555-566, 2009.

MUELLER, I.; SHAKRI, A. R.; CHITNIS, C. E. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine*, v. 33, n. 52, p. 7489-7495, 2015.

MÚFALO, B. C.; GENTIL, F.; BARGIERI, D. Y.; COSTA, F. T.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. *Microbes and infection*, v. 10, n. 12-13, p. 1266-1273, 2008.

NAIK, R. S.; BRANCH, O. H.; WOODS, A. S.; VIJAYKUMAR, M.; PERKINS, D. J.; NAHLEN, B. L.; LAL, A. A.; COTTER, R. J.; COSTELLO, C. E.; OCKENHOUSE, C. F.; DAVIDSON, E. A.; GOWDA, D. C. Glycosylphosphatidylinositol Anchors of *Plasmodium falciparum*: Molecular Characterization and Naturally Elicited Antibody Response That May Provide Immunity to Malaria Pathogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 192, n. 11, p. 1563-1576, 2000.

NAIR, M.; HINDS, M. G.; COLEY, A. M.; HODDER, A. N.; FOLEY, M.; ANDERS, R. F.; ET AL. Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate, *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1). *Journal of molecular biology*, v. 322, n. 4, p. 741-753, 2002.

NANAN, R.; HEINRICH, D.; FROSCH, M.; KRETH, H. W. Acute and long-term effects of booster immunisation on frequencies of antigen-specific memory B-lymphocytes. *Vaccine*, v. 20, n. 3, p. 498-504, 2001.

NARUM, D. L.; OGUN, S. A.; THOMAS, A. W.; HOLDER, A. A. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. *Infection and immunity*, v. 68, n. 5, p. 2899-2906, 2000.

NARUM, D. L.; THOMAS, A. W. Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 67, n. 1, p. 59-68, 1994.

NEBIE, I.; DIARRA, A.; OUEDRAOGO, A.; TIONO, A. B.; KONATE, A. T.; GANSANE, A.; SOULAMA, I.; COUSENS, S.; LEROY, O.; SIRIMA, S. B. Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa. *Infection and immunity*, v. 76, n. 2, p. 759-766, 2008.

NDUATI, E. W.; NG, D. H.; NDUNGU, F. M.; GARDNER, P.; URBAN, B. C.; LANGHORNE, J. Distinct kinetics of memory B-cell and plasma-cell responses in peripheral blood following a blood-stage *Plasmodium chabaudi* infection in mice. *PLoS One*, v. 5, n. 11, p. e15007. 2010.

NDUATI, E.; GWELA, A.; KARANJA, H.; MUGYENYI, C.; LANGHORNE, J.; MARSH, K.; URBAN, B. C. The plasma concentration of the B cell activating factor is increased in children with acute malaria. *Journal of Infectious Diseases*, v. 204, n. 6, p. 962-970, 2011.

NDUNGU, F. M.; OLOTU, A.; MWACHARO, J.; NYONDA, M.; APFELD, J.; MRAMBA, L. K.; FEGAN, G. W.; BEJON, P.; MARSH, K. Memory B cells are a more reliable archive for historical antimalarial responses than plasma antibodies in no-longer exposed children. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 21, p. 8247-8252, 2012.

NDUNGU, F. M.; LUNDBLOM, K.; RONO, J.; ILLINGWORTH, J.; ERIKSSON, S.; FARNERT, A. Long-lived *Plasmodium falciparum* specific memory B cells in naturally exposed Swedish travelers. *European Journal of immunology*, v. 43, n. 11, p. 2919-2929, 2013.

NOGARO, S. I.; HAFALLA, J. C.; WALTHER, B.; REMARQUE, E. J.; TETTEH, K. K. A.; CONWAY, D. J.; RILEY, E. M.; WALTHER, M. The Breadth, but Not the Magnitude, of Circulating Memory B Cell Responses to *P. falciparum* Increases with Age/Exposure in an Area of Low Transmission. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, e25582, 2011.

O'DONNELL, R. A.; DE KONING-WARD, T. F.; BURT, R. A.; BOCKARIE, M.; REEDER, J. C.; COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1₁₉ are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *Journal of Experimental Medicine*, v. 193, n. 12, p. 1403-1412, 2001.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; VARGAS-SERRATO, E.; BARNWELL, J. W.; MORENO, A.; GALINSKI, M. R. Immunogenicity of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-9 recombinant proteins expressed in *E. coli*. *Vaccine*, v. 22, n. 15, p. 2023-2030, 2004.

OSIER, F. H.; FEGAN, G.; POLLEY, S. D.; MURUNGI, L.; VERRA, F.; TETTEH, K. K.; LOWE, B.; MWANGI, T.; BULL, P. C.; THOMAS, A. W.; CAVANAGH, D. R.; MCBRIDE, J. S.; LANAR, D. E.; MACKINNON, M. J.; CONWAY, D. J.; MARSH, K. Breadth and magnitude of antibody responses to multiple *Plasmodium falciparum*

merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infection and immunity*, v. 76, n. 5, p. 2240-2248, 2008.

PASCUAL, V.; LIU, Y. J.; MAGALSKI, A.; DE BOUTEILLER, O.; BANCHEREAU, J.; CAPRA, J. D. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *The Journal of experimental medicine*, v. 180, n. 1, p. 329-339, 1994.

PERRAUT, R.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; MATTEI, D.; BOURREAU, E.; GARRAUD, O.; BONNEMAINS, B.; PEREIA DE SILVA, L.; MICHEL, J. C. Induction of opsonizing antibodies after injection of recombinant *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens in preimmune Saimiri sciureus monkeys. *Infect Immun.* v. 63, n. 2, p. 554-562, 1995.

PERSSON, K. E.; FOWKES, F. J.; MCCALLUM, F. J.; GICHERU, N.; REILING, L.; RICHARDS, J. S.; WILSON, D. W.; LOPATICKI, S.; COWMAN, A. F.; MARSH, K.; BEESON, J. G. Erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* are targets of human inhibitory antibodies and function to evade naturally acquired immunity. *The Journal of immunology*, v. 191, n. 2, p. 785-794, 2013.

PERSSON, K. E.; MCCALLUM, F. J.; REILING, L.; LISTER, N. A.; STUBBS, J.; COWMAN, A. F.; MARSH, K.; BEESON, J. G. Variation in use of erythrocyte invasion pathways by *Plasmodium falciparum* mediates evasion of human inhibitory antibodies. *The Journal of clinical investigation*, v. 118, n. 1, p. 342-351, 2008.

PHIMPRAPHI, W.; PAUL, R. E.; YIMSAMRAN, S.; PUANGSA-ART, S.; THANYAVANICH, N.; MANEEBOONYANG, W.; PROMMONGKOL, S.; SORNKLOM, S.; CHAIMUNGKUN, W.; CHAVEZ, I. F.; BLANC, H.; LOOAREESUWAN, S.; SAKUNTABHAI, A.; SINGHASIVANON, P. Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in a Karen population in Thailand. *Malaria Journal*, v. 7, n. 1, p. 99, 2008.

PHYO, A. P.; NKHOMA, S.; STEPNIIEWSKA, K.; ASHLEY, E. A.; NAIR, S.; MC GREARY, R.; LER MOO, C.; AL-SAAI, S.; DONDORP, A. M.; LWIN, K. M.; SINGHASIVANON, P.; DAY, N. P.; WHITE, N. J.; ANDERSON, T. J.; NOSTEN, F.. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *The Lancet*, v. 379, n. 9830, p. 1960-1966, 2012.

PIZARRO, J. C.; VULLIEZ-LE NORMAND, B.; CHESNE-SECK, M. L.; COLLINS, C. R.; WITHERS-MARTINEZ, C.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M. J.; FABER, B. W.; REMARQUE, E. J.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BENTLEY, G. A. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science*, v. 308, n. 5720, p. 408-411, 2005.

PLEASS, R. J.; HOLDER, A. A. Antibody-based therapies for malaria. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, n. 11, p. 893-899, 2005.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. *Clinical infectious disease*, v. 47, n. 3, p. 401-409, 2008.

POLLEY, S. D.; MWANGI, T.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; DUTTA, S.; LANAR, D. E.; REMARQUE, E.; ROSS, A.; WILLIAMS, T. N.; MWAMBINGU, G.; LOWE, B.; CONWAY, D. J.; MARSH, K. Human antibodies to recombinant protein constructs of *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) and their associations with protection from malaria. *Vaccine*, v. 23, n. 5, p. 718-728, 2004.

POMBO, D. J., G. LAWRENCE, C. HIRUNPETCHARAT, C. RZEPczyk, M.BRYDEN, N. CLOONAN, K. ANDERSON, Y. MAHAKUNKIJAROEN, L. B. MARTIN, D. WILSON, S. ELLIOTT, S. ELLIOTT, D. P. EISEN, J. B. WEINBERG, A. SAUL, M. F. GOOD. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *The Lancet*, v. 360, n. 9333, p. 610–617, 2002.

PORTUGAL, S.; DOUMTABE, D.; TRAORE, B.; MILLER, L. H.; TROYE-BLOMBERG, M.; DOUMBO, O. K.; DOLO, A.; PIERCE, S. K.; CROMPTON, P. D. B cell analysis of ethnic groups in Mali with differential susceptibility to malaria. *Malaria Journal*, v. 11, p. 162, 2012.

PORTUGAL, S.; PIERCE, S. K.; CROMPTON, P. D. Young lives lost as B cells falter: what we are learning about antibody responses in malaria. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 7, p. 3039-3046, 2013.

PORTUGAL, S.; TIPTON, C. M.; SOHN, H.; KONE, Y.; WANG, J.; LI, S.; SKINNER, J.; VIRTANEVA, K.; STURDEVANT, D. E.; PORCELLA, S. F.; DOUMBO, O. K.; DOUMBO, S.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA, A.; TRAORE, B.; SANZ, I.; PIERCE, S. K.; CROMPTON, P. D. Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. *eLIFE*, v. 8, e07218, 2015.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUES, C. D.; ATAÍDE, R.; MOTA, M. M. Dissecting *in vitro* host cell infection by *Plasmodium* sporozoites using flow cytometry. *Cellular microbiology*, v. 10, n. 1, p. 218-224, 2008.

PUTAPORNTIP, C.; HONGSRIMUANG, T.; SEETHAMCHAI, S.; KOBASA, T.; LIMKITTIKUL, K.; CUI, L.; JONGWUTIWES, S. Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand. *Journal of Infectious Diseases*, v. 199, n. 8, p.1143-1150, 2009.

RAMESH, C. K. Introduction to recombinant vaccines. Raleigh: Laxmi Book Publication, Solapur, 2017.

RAPPUOLI, R. Reverse vaccinology. *Current opinion in microbiology*, v. 3, n. 5, p. 445-450, 2000.

REMARQUE, E. J.; FABER, B. W.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitology*, v. 24, n. 2, p. 74-84, 2008.

RENNENBERG, A.; LEHMANN, C; HEITMANN, A.; WITT, T.; HANSEN, G.; NAGARAJAN, K.; DESCHEMEIER, C.; TURK, V.; HILGENFELD, R.; HEUSSLER, V. T. Exoerythrocytic *Plasmodium* parasites secrete a cysteine protease inhibitor

involved in sporozoite invasion and capable of blocking cell death of host hepatocytes. PLoS Pathogens, v. 6, n. 3, e1000825, 2010.

REQUENA, P.; CAMPO, J. J.; UMBERS, A. J.; OME, M.; WANGNAPI, R.; BARRIOS, D.; ROBINSON, L. J.; SAMOL, P.; ROSANAS-URGELL, A.; UBILLOS, I.; MAYOR, A.; LÓPEZ, M.; DE LAZZARI, E.; ARÉVALO-HERRERA, M.; FERNÁNDEZ-BECERRA, C.; DEL PORTILLO, H.; CHITNIS, C. E.; SIBA, P. M.; BARDAJÍ, A.; MUELLER, I.; ROGERSON, S.; MENÉNDEZ, C.; DOBAÑO, C. Pregnancy and malaria exposure are associated with changes in the B cell pool and in plasma eotaxin levels. The Journal of Immunology, v. 193, n. 6, p. 2971-2983, 2014.

RIGLAR, D. T., RICHARD, D., WILSON, D. W., BOYLE, M. J., DEKIWADIA, C., TURNBULL, L., BAUM, J. Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. Cell host & microbe, v. 9, n. 1, p. 9-20, 2011.

RILEY, E. Malaria vaccine trials: SPf66 and all that. Current opinion in microbiology, v. 7, n. 5, p. 612-616, 1995.

RILEY, E. M.; STEWART, A. V. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. Nature Medicine, v. 19, n. 2, p. 168-178, 2013.

RILEY, E. M.; WAHL, S.; PERKINS, D. J.; SCHOFIELD, L. Regulating immunity to malaria. Parasite Immunology, v. 28, n. 1-2, p. 35-49, 2006.

ROBINSON, L. J.; WAMPFLER, R.; BETUELA, I.; KARL, S.; WHITE, M. T.; LI W. A. I., SUEN C. S.; HOFMANN, N. E.; KINBORO, B.; WALTMANN, A.; BREWSTER, J.; LORRY, L.; TARONGKA, N.; SAMOL, L.; SILKEY, M.; BASSAT, Q.; SIBA, P. M.; SCHOFIELD, L.; FELGER, I.; MUELLER, I. Strategies for understanding and reducing the *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* hypnozoite reservoir in Papua New Guinean children: a randomised placebo-controlled trial and mathematical model. PLoS Medicine, v. 12, n. 10, e1001891, 2015.

RODRIGUES, M. H.; RODRIGUES, K. M.; OLIVEIRA, T. R.; CÔMODO, A. N.; RODRIGUES, M. M.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; SOARES, I. S. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. International journal for parasitology, v. 35, n. 2, p. 185-192, 2005.

RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; MARTINS-DA-SILVA, J. H.; SINGH, B.; JIANG, J.; MEYER, E. V.; SANTOS, F.; BANIC, D. M.; MORENO, A.; GALINSKI, M. R.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LIMA-JUNIOR, J. C. *In silico* Identification and Validation of a Linear and Naturally Immunogenic B-Cell Epitope of the *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate Merozoite Surface Protein-9. PLoS One, v. 11, n. 1, e0146951, 2016.

ROWE, J. A.; CLAESSENS, A.; CORRIGAN, R. A.; ARMAN, M. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. Expert reviews in molecular medicine, v. 11, p. e16, 2009.

ROWLAND, S. L.; LEAHY, K. F.; HALVERSON, R.; TORRES, R. M.; PELANDA, R. BAFF Receptor Signaling Aids the Differentiation of Immature B Cells into Transitional B Cells following Tonic BCR Signaling. *The Journal of Immunology*, v. 185, n. 8, p. 4570-4581, 2010.

SABCHAREON, A.; BURNOUF, T.; OUATTARA, D.; ATTANATH, P.; BOUHAROUN-TAYOUN, H.; CHANTAVANICH, P.; FOUCAULT C, CHONGSUPHAJAJISIDDHI T, DRUILHE P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 45, n. 3, p. 297-308, 1991.

SACHS, J.; MALANEY, P. The economic and social burden of malaria. *Nature*, v. 415, n. 6872, p. 680-685, 2002.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA. A., ARAKI, K.; AHMED, R. From vaccines to memory and back. *Immunity*, v. 33, n. 4, p. 451-463, 2010.

SÁNCHEZ-ARCILA, J. C.; DE FRANÇA, M. M.; PEREIRA, V. A.; VASCONCELOS M. P.; TÊVA, A.; PERCE-DA-SILVA, D. S.; NETO, J. R.; APRÍGIO, C. J.; LIMA-JUNIOR, J. C.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S.; BANIC, D. M.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. The influence of intestinal parasites on *Plasmodium vivax*-specific antibody responses to MSP-1₁₉ and AMA-1 in rural populations of the Brazilian Amazon. *Malaria journal*, v. 14, p. 442, 2015.

SANZ, I.; WEI, C.; LEE, F. E., ANOLIK, J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Seminars in Immunology*, v. 20, n. 1, p. 67-82, 2008.

SCHERF, A.; LOPEZ-RUBIO, J. J.; RIVIERE, L. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Annual Review of Microbiology*, v. 62, p. 445-470, 2008.

SCHOFIELD, L.; MUELLER, I. Clinical immunity to malaria. *Current molecular medicine*, v. 6, n. 2, p. 205-221, 2006.

SCHOLZEN, A.; SAUERWEIN, R. W. How malaria modulates memory: activation and dysregulation of B cells in *Plasmodium* infection. *Trends in parasitology*, v. 29, n. 5, p. 252-262, 2013.

SCHOLZEN, A.; TEIRLINCK, A. C.; BIJKER, E. M.; ROESTENBERG, M.; HERMSEN, C. C.; HOFFMAN, S. L.; SAUERWEIN, R. W. BAFF and BAFF receptor levels correlate with B cell subset activation and redistribution in controlled human malaria infection. *The Journal of Immunology*, v. 192, n. 8, p. 3719–3729, 2014.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO (SES/RJ). Boletim epidemiológico 01/2015: Análise epidemiológica de casos na região de Mata Atlântica, Estado do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://www.cib.rj.gov.br/arquivos-para-baixar/anexos/1576--15/file.html>>. Acesso out. 2015.

SETH, R. K.; BHAT, A. A.; RAO, D. N.; BISWAS, S. Acquired immune response to defined *Plasmodium vivax* antigens in individuals residing in northern India. *Microbes and infection*, v. 12, n. 3, p. 199-206, 2010.

SHAFFER, A. L.; ROSENWALD, A.; STAUDT, L. M. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, n. 12, p. 920-933, 2002.

SHI, Y.; AGEMATSU, K.; OCHS, H. D.; SUGANE, K. Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD⁺CD27⁺ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. *Clinical Immunology*, v. 108, n. 2, p. 128-137, 2003.

SILVIE, O.; FRANETICH, J. F.; CHARRIN, S.; MUELLER, M. S.; SIAU, A.; BODESCOT, M.; RUBINSTEIN, E.; HANNOUN, L.; CHAROENVIT, Y.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; VAN GEMERT, G. J.; SAUERWEIN, R. W.; BLACKMAN, M. J.; ANDERS, R. F.; PLUSCHKE, G.; MAZIER, D. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 10, p. 9490-9496, 2004.

SIMS, G. P.; ETTINGER, R.; SHIROTA, Y.; YARBORO, C. H.; ILLEI, G. G.; LIPSKY, P. E. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*, v. 105, n. 11, p. 4390-4398, 2005.

SINGH, B.; SUNG, L. K.; MATUSOP, A.; RADHAKRISHNAN, A.; SHAMSUL, S. S.; COX-SINGH, J.; THOMAS, A. CONWAY, D. J. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet*, v. 363, n. 9414, p.1017-1024, 2004.

SINGH, S.; ALAM, M. M.; PAL-BHOWMICK, I.; BRZOSTOWSKI, J. A.; CHITNIS, C. E. Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. *PLoS pathogens*, v. 6, n. 2, e1000746, 2010.

SINNIS, P.; ZAVALA, F. The skin stage of malaria infection: biology and relevance to the malaria vaccine effort. *Future Microbiology*, v. 3, n. 275-278, 2008.

SMITH, K. G.; HEWITSON, T. D.; NOSSAL, G. J. V.; TARLINTON, D. M. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *European journal of immunology*, v. 26, n. 2, p. 444-448, 1996.

SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 31, n. 3, p. 317-332, 1998.

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

SPRENT, J. Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, v. 5, n. 3, p. 433-438, 1993.

STANISIC, D. I.; BARRY, A. E.; GOOD, M. F. Escaping the immune system: How the malaria parasite makes vaccine development a challenge. *Trends in parasitology*, v. 29, n. 12, p. 612-622, 2013.

STANISIC, D. I.; RICHARDS, J. S.; MCCALLUM, F. J.; MICHON, P.; KING, C. L.; SCHOEPFLIN, S.; GILSON, P. R.; MURPHY, V. J.; ANDERS, R. F.; MUELLER, I.; BEESON, J. G. Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infection and immunity*, v. 77, n. 3, p. 1165-1174, 2009.

STEVENSON, M. M.; ING, R.; BERRETTA, F.; MIU, J. Regulating the Adaptive Immune Response to Blood-Stage Malaria: Role of Dendritic Cells and CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *International journal of biological sciences*, v. 7, n. 9, p. 1311-1322, 2011.

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

STOWERS, A. W.; KENNEDY, M. C.; KEEGAN, B. P.; SAUL, A.; LONG, C. A.; MILLER, L. H. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. *Infection and immunity*, v. 70, n. 12, p. 6961-6967, 2002.

STRUIK, S. S.; RILEY, E. M. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunological Reviews*, v. 201: 268-290, 2004.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J. M.; MENARD, R.; HEUSSLER, V. T. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science*, v. 313, n. 5791, p. 1287-1290, 2006.

SUBRAMANIAM, K. S.; SKINNER, J.; IVAN, E.; MUTIMURA, E.; KIM, R. S.; FEINTUCH, C. M.; DAILY, J. P. HIV Malaria Co-Infection Is Associated with Atypical Memory B Cell Expansion and a Reduced Antibody Response to a Broad Array of *Plasmodium falciparum* Antigens in Rwandan Adults. *PLoS ONE*, v. 10, n. 4, e0124412, 2015.

SULLIVAN, R. T.; KIM, C. C.; FONTANA, M. F.; FEENEY, M. E.; JAGANNATHAN, P.; BOYLE, M. J.; DRAKELEY, C. J.; SSEWANYANA, I.; NANKYA, F.; MAYANJA-KIZZA, H.; DORSEY, G.; GREENHOUSE, B. FCRL5 Delineates Functionally Impaired Memory B Cells Associated with *Plasmodium falciparum* Exposure. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 5, e1004894, 2015.

SULLIVAN, R. T.; SSEWANYANA, I.; WAMALA, S.; NANKYA, F.; JAGANNATHAN, P.; TAPPERO, J. W.; MAYANJA-KIZZA, H.; MUHINDO, M. K.; ARINAITWE, E.; KAMYA, M.; DORSEY, G.; FEENEY, M. E.; RILEY, E. M.; DRAKELEY, C. J.;

GREENHOUSE, B.; SULLIVAN, R. B cell sub-types following acute malaria and associations with clinical immunity. *Malaria journal*, v. 3, n. 15, p. 139, 2016.

SUSS-TOBY, E.; ZIMMERBERG, J.; WARD, G. E. *Toxoplasma* invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 16, p. 8413-8418, 1996.

SVS-MS. Ações de controle da malária: Manual para profissionais de saúde da atenção básica, 2005. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/05_0001_M.pdf>. Acesso em: out. 2015.

SVS-MS. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. 2ed., 2009. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/27/Manual-de-diagn--stico-laboratorial-da-mal-ria-2-ed..pdf>>. Acesso em: out. 2015.

TAKALA, S. L.; PLOWE, C. V. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'. *Parasite immunology*, v. 31, n. 9, p. 560-573, 2009.

TANGYE, S. G.; TARLINTON, D. M. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *European Journal of immunology*, v. 39, n. 8, p. 2065-2075, 2009.

TARLINTON, D.; RADBRUCH, A.; HIEPE, F.; DÖRNER, T. Plasma cell differentiation and survival. *Current opinion in immunology*, v. 20, n. 2, p. 162-169, 2008.

TAYLOR-ROBINSON, A. W. Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitology today*, v. 11, n. 9, p. 334-342, 1995.

TAYLOR-ROBINSON, A. W.; PHILLIPS, R. S.; SEVERN, A.; MONCADA, S.; LIEW, F.Y. The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. *Science*, v. 260, n. 5116, p. 1931-1934, 1993.

TEO, A.; FENG, G.; BROWN, G. V.; BEESON, J. G.; ROGERSON, S. J. Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. *Trends in parasitology*, v. 32, n. 11, p. 887-898, 2016.

THOMAS, A. W.; DEANS, J. A.; MITCHELL, G. H.; ALDERSON, T.; COHEN, S. The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 13, n. 2, p. 187-99, 1984.

TONGREN, J. E.; DRAKELEY, C. J.; MCDONALD, S. L.; REYBURN, H. G.; MANJURANO, A.; NKYA, W. M.; LEMNGE, M. M.; GOWDA, C. D.; TODD, J. E.; CORRAN, P. H.; RILEY, E. M. Target antigen, age, and duration of antigen exposure independently regulate immunoglobulin G subclass switching in malaria. *Infection and immunity*, v. 74, n. 1, p. 257-264, 2006.

TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, n. 10, p. 735-747, 2002.

TRAORE, B.; KONÉ, Y.; DOUMBO, S.; DOUMTABÉ, D.; TRAORÉ, A.; CROMPTON, P. D.; PIERCE, S. K. The TLR9 agonist CpG fails to enhance the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in semi-immune adults in Mali. *Vaccine*, v. 27, n. 52, p. 7299-7303, 2009.

TRAPE, J. F.; TALL, A.; DIAGNE, N.; NDIATH, O.; LY, A. B.; FAYE, J.; DIEYE-BA, F.; ROUCHER, C.; BOUGANALI, C.; BADIANE, A.; SARR, F. D.; MAZENOT, C.; TOURÉ-BALDÉ, A.; RAOULT, D.; DRUILHE, P.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; ROGIER, C.; SOKHNA, C. Malaria morbidity and pyrethroid resistance after the introduction of insecticide-treated bednets and artemisinin-based combination therapies: a longitudinal study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 11, n. 12, p. 925-932, 2011.

TRIEU, A.; KAYALA, M. A.; BURK, C.; MOLINA, D. M.; FREILICH, D. A.; RICHIE, T. L.; BALDI P.; FELGNER P. L.; DOOLAN D. L. Sterile protective immunity to malaria is associated with a panel of novel *P. falciparum* antigens. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 10, n. 9, p. M111-007948, 2011.

TRIGLIA, T.; HEALER, J.; CARUANA, S. R.; HODDER, A. N.; ANDERS, R. F.; CRABB, B. S.; COWMAN, A. F. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Molecular microbiology*, v. 38, n. 4, p. 706-718, 2000.

TROTTEIN, F.; THOMPSON, J.; COWMAN, A. F. Cloning of a new cation ATPase from *Plasmodium falciparum*: conservation of critical amino acids involved in calcium binding in mammalian organellar Ca²⁺-ATPases. *Gene*, v. 158, n. 1, p. 133-137, 1995.

TSE, S. W.; RADTKE, A. J.; ZAVALA, F. Induction and maintenance of protective CD8⁺ T cells against malaria liver stages: implications for vaccine development. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, p. 172-178, 2011.

UDHAYAKUMAR, V.; KARIUKI, S.; KOLCZACK, M.; GIRMA, M.; ROBERTS, J. M.; OLOO, A. J.; NAHLEN, B. L.; LAL, A. A. Longitudinal study of natural immune responses to the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen (AMA-1) in a holoendemic region of malaria in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project VIII. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, n. 2, p. 100-107, 2001.

URBAN, B. C.; FERGUSON, D. J.; PAIN, A.; WILLCOX, N.; PLEBANSKI, M.; AUSTYN, J. M.; ROBERTS, D. J. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature*, v. 400, n. 6739, p. 73-77, 1999.

VARGAS-SERRATO, E.; CORREDOR, V.; GALINSKI, M. R. Phylogenetic analysis of CSP and MSP-9 gene sequences demonstrates the close relationship of *Plasmodium coatneyi* to *Plasmodium knowlesi*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 3, n. 1, p. 67-73, 2003.

VEKEMANS, J.; BALLOW, W.R. *Plasmodium falciparum* malaria vaccines in development. Expert Review of Vaccines, v. 7, n. 2, p. 223-240, 2008.

WALTHER, M.; TONGREN, J. E.; ANDREWS, L.; KORBEL, D.; KING, E.; FLETCHER, H.; ANDERSEN, R. F.; BEJON, P.; THOMPSON, F.; DUNACHIE, S. J.; EDELE, F.; DE SOUZA, J. B.; SINDEN, R. E.; GILBERT, S. C.; RILEY, E. M.; HILL A. V. S. Up-regulation of TGF- α , FOXP3, and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. Immunity, v. 23, p. 287-296, 2005.

WEISS, G. E.; CROMPTON, P. D.; LI, S.; WALSH, L. A.; MOIR, S.; TRAORE, B.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA, A.; DOUMBO, O. K.; PIERCE, S. K. Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. The Journal of Immunology, v. 183, n. 3, p. 2176–2182, 2009.

WEISS, G. E.; TRAORE, B.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA, A.; DOUMBO, S.; DOUMTABE, D.; KONE, Y.; DIA, S.; GUINDO, A.; TRAORE, A.; HUANG, C. Y.; MIURA, K.; MIRCETIC, M.; LI, S.; BAUGHMAN, A.; NARUM, D. L.; MILLER, L. H.; DOUMBO, O. K.; PIERCE, S. K.; CROMPTON, P. D. The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. PLoS Pathogens, v. 6, n. 5, e1000912, 2010.

WEISS, G. E.; CLARK, E. H.; LI, S.; TRAORE, B.; KAYENTAO, K.; ONGOIBA, A.; HERNANDEZ, J. N.; DOUMBO, O. K.; PIERCE, S. K.; BRANCH, O. H.; CROMPTON, P. D. A positive correlation between atypical memory B cells and *Plasmodium falciparum* transmission intensity in cross-sectional studies in Peru and Mali. PLoS ONE, v. 6, n. 1, e15983, 2011.

WEISS, G. E.; NDUNGU, F. M.; MCKITTRICK, N.; LI, S.; CROMPTON, P. D.; MARSH, K.; PIERCE, S. K. High efficiency human memory B cell assay and its application to studying *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in natural infections. Journal of Immunological Methods, v. 375, n. 1, p. 6874, 2012.

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. Clinical infectious diseases, v. 46, n. 2, p. 172-173. 2008.

WHO. World Malaria Report 2010. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241564106/en/index.html>. Acesso em: maio, 2016.

WHO. World Malaria Report 2015. Disponível em: <http://www.rbm.who.int/>. Acesso em: maio, 2016.

WICKRAMARACHCHI, T.; PREMARATNE, P. H.; PERERA, K. L.; BANDARA, S.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; HANDUNNETTI, S. M.; UDAGAMA-RANDENIYA, P. V. Natural human antibody responses to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. Infection and immunity, v. 74, n. 1, p. 798-801, 2006.

WIPASA, J.; ELLIOTT, S.; XU, H.; GOOD, M. F. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. *Immunology and cell biology*, v. 80, n. 5, p. 401-414, 2002.

WIPASA, J.; SUPHAVILAI, C.; OKELL, L. C.; COOK, J.; CORRAN, P. H.; THAIKLA, K.; LIEWSAREE, W.; RILEY, E. M.; HAFALLA, J. C. Longlived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 2, e1000770, 2010.

WIRTHS, S.; LANZAVECCHIA, A. ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *European Journal of immunology*, v. 35, n. 12, p. 3433-3441, 2005.

WRAMMERT, J.; SMITH, K.; MILLER, J.; LANGLEY, W. A.; KOKKO, K.; et al. Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus. *Nature* 453, n. 7195, p. 667-671, 2008.

WYKES, M. N.; HORNE-DEBETS, J. M.; LEOW, C. I.; KARUNARATHNE, D. S. Malaria drives T cells to exhaustion. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 249, 2014.

WYKES, M. N.; ZHOU, Y. H.; LIU, X. Q.; GOOD, M. F. *Plasmodium yoelii* can ablate vaccine-induced long-term protection in mice. *The Journal of Immunology*, v. 175, n. 4, p. 2510-2516, 2005.

XU, H.; HODDER, A. N.; YAN, H.; CREWETHER, P. E.; ANDERS, R. F.; GOOD, M. F. CD4+ T cells acting independently of antibody contribute to protective immunity to *Plasmodium chabaudi* infection after apical membrane antigen 1 immunization. *The Journal of Immunology*, v. 165, n. 1, p. 389-396, 2000.

ZAKERI, S.; SADEGHI, H.; MEHRIZI, A. A.; DJADID, N. D. Population genetic structure and polymorphism analysis of gene encoding apical membrane antigen-1 (AMA-1) of Iranian *Plasmodium vivax* wild isolates. *Acta tropica*, v. 126, n. 3, p. 269-279, 2013.

ZANINI, G. M.; DE MOURA CARVALHO, L. J.; BRAHIMI, K.; DE SOUZA-PASSOS, L. F.; GUIMARÃES, S. J.; DA SILVA, MACHADO E.; BIANCO-JUNIOR, C.; RICCIO, E. K.; DE SOUSA, M. A.; ALECRIM, M. D.; LEITE, N.; DRUILHE, P.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Sera of patients with systemic lupus erythematosus react with plasmodial antigens and can inhibit the *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum*. *Autoimmunity*, v. 42, n. 6, p. 545-552, 2009.

ZAVALA, F.; TAM, J. P.; BARR, P. J.; ROMERO, P. J.; LEY, V.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V. Synthetic peptide vaccine confers protection against murine malaria. *J Exp Med.*, v. 166, n. 5, p. 1591-1596, 1987.

ZOTOS, D.; TARLINTON, D. M. Determining germinal centre B cell fate. *Trends in immunology*, v. 33, n. 6, p. 281-288, 2012.

Anexos

ANEXO A - Cluster of differentiation (CDs)

CD	Nomes alternativos	Estrutura molecular	Funções conhecidas ou propostas
CD3	Leu4	Composto por cadeias CD3 γ , CD3 δ e CD3 ϵ relacionadas à superfamília das Igs; 20 a 30kD	Co-receptor de células T. Suas cadeias se associam ao receptor de células T (TCR) e à cadeia zeta a fim de gerar sinais de ativação para linfócitos T.
CD10	CALLA	100kD; proteína da membrana tipo II	Envolvida no desenvolvimento das células B. Expresso em células B imaturas sendo perdida expressão em seguida. É expresso novamente em células B em proliferação no CG.
CD19	B4	95kD; superfamília das Igs	Expresso na maioria das células B. Envolvida no desenvolvimento, ativação e diferenciação de células B; forma um complexo correceptor com CD21 e CD81 (TAPA-1) que enviam sinais que atuam em sinergia com os sinais do BCR.
CD20	B1; Bp35	35-37kD; família tetraspan (TM4SF); proteína transmembrana tipo III	Expresso na maioria das células B (não em células plasmáticas). Participa da ativação ou regulação das células B; formação de canal de cálcio na membrana de células B permitindo o influxo de cálcio necessário para sua ativação.
CD21	CR2; receptor C3d; B2	145kD; regulador da ativação do complemento; proteína transmembrana tipo I	Expresso na superfície de B maduras. Receptor do fragmento C3d; forma complexo com CD19 e CD81 que envia sinais ativadores para células B; receptor para vírus Epstein-Barr.
CD27	S152; T14	50-55kD; proteína de membrana tipo I; pertence a superfamília de receptores de TNF	Presente na superfície de células B de memória clássicas e plasmáticas. Liga-se a CD70. Desempenha papel na coestimulação da ativação de células T e regulação e proliferação de B. O domínio citoplasmático de CD27 interage com TRAF2 e TRAF5 e induz a ativação de NF-kB e SAPK/JNK.

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Perfil de células B de memória e de células B reguladoras (Breg) observadas durante e após a infecção malárica humana por *P. falciparum*: implicações no desenvolvimento de imunidade”

Eu, _____, com _____ anos de idade, fui contatado por um membro ou representante da equipe de pesquisa coordenada pela professora Dra. Kézia K. G. Scopel, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Juiz de Fora, e solicitado a doar uma pequena quantidade do meu sangue para utilização no projeto de pesquisa sobre os parasitas da malária citado acima. Fui informado que este projeto pretende investigar como o organismo se defende dos parasitas da malária e como o parasita pode alterar os mecanismos naturais de defesa do organismo. Para isso, os pesquisadores necessitam de 40 ml de sangue venoso de pacientes com malária e em alguns momentos depois do tratamento. O sangue será colhido através de punção venosa asséptica com material limpo e descartável. Fui esclarecido que sentirei o equivalente a uma “picada de injeção na veia”, e que os riscos deste procedimento são mínimos, em nada alterando o meu tratamento para malária. Fui esclarecido também que a minha participação voluntária é muito importante para o estudo desenvolvido pelos pesquisadores. Finalmente, fui informado que as informações sobre a minha pessoa e a minha participação no estudo serão mantidas em sigilo.

Considero-me satisfeito com as explicações fornecidas e concordo em participar como voluntário (a) deste estudo.

Acrelândia, _____ de _____ de 200 .

Nome: _____

Assinatura : _____

Kézia K. G. Scopel, Roberta Reis Soares ou membro da equipe

(Documento em duas vias, 01 para o voluntário, 01 para o pesquisador)

Endereço para contato:

Depto de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia. Av. Dr. Lourenço Kelmer S/no. Bairro Martelos, Juiz de Fora-MG. CEP:36036-900. Tel: (32)-8801-2878.

ANEXO C – Questionários clínicos-epidemiológicos

PROJETO: "PERFIL DE CÉLULAS B DE MEMÓRIA E DE CÉLULAS B REGULADORAS (BREG)
OBSERVADAS DURANTE E APÓS A INFECÇÃO MALÁRICA HUMANA POR *P. falciparum* e *P. vivax*:
IMPLICAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DE IMUNIDADE"

FICHA INDIVIDUAL DE ACOMPANHAMENTO (visita dia 0)

DATA: __/__/__

A. DADOS PESSOAIS:

ID: ____ NOME: _____ APELIDO: _____
RAMAL: _____ LOCALIDADE: _____
Data de nascimento: _____ Idade: _____
Local de nascimento: _____
Sexo: _____ ENTREVISTADOR: _____
Tempo que mora na Amazônia: ____anos ____meses
Tempo que mora na localidade: ____anos ____meses
Tempo que mora nesta casa: ____anos ____meses

B. HISTÓRICO DE MIGRAÇÃO

Antes de vir para esta localidade, onde o Sr. (a) morava?
(Informações sobre até 4 localidades de residência antes de sair)

	1	2	3	4
Nome da localidade				
Município da localidade				
Estado				
Ano em que saiu da localidade				
Localidade era campo ou residência				
Tempo de residência na localidade				

C. HÁBITOS/ATIVIDADES

Pesca/caça na beira do rio? () sim () não Dorme na beira do rio? () sim () não
Atividade na mata entre 18 e 6h? () sim () não () de vez em quando () todos os dias
Qual atividade? _____
Dias de permanência na comunidade: _____
Deslocamentos:
Nos últimos 15 dias: _____
Nos últimos 30 dias: _____

D. MALÁRIA PRÉVIA

SINTOMAS NO ÚLTIMO MÊS:

Você já teve malária (diagnosticada pela FUNASA)? () Sim () Quantas? _____ () Não () Não se lembra/não sabe
Já teve malária vivax? () Sim () Não () Não se lembra/não sabe
Já teve malária falciparum? () Sim () Não () Não se lembra/não sabe
Última malária há: _____ Espécie: _____

E. DADOS CLÍNICOS

Peso: _____ kg
Sintomas no último mês:
Teve sintomas nos últimos 30 dias? () Sim () Não
Teve sintomas nos últimos 30 dias? () Sim () Não
Início dos sintomas: _____ Parou há quantos dias? _____

Intensidade deve ser classificada pelo próprio paciente em fraca (leve), mais ou menos (moderada) ou forte (intensa)

Sintomas apresentados nos últimos 30d	Sintomas apresentados nos últimos 7d
Febre () leve () moderado () intenso	Febre () leve () moderado () intenso
Calafrios () leve () moderado () intenso	Calafrios () leve () moderado () intenso
Sudorese () leve () moderado () intenso	Sudorese () leve () moderado () intenso
Fraqueza () leve () moderado () intenso	Fraqueza () leve () moderado () intenso
Cefaleia () leve () moderado () intenso	Cefaleia () leve () moderado () intenso
Perda apetite () leve () moderado () intenso	Perda apetite () leve () moderado () intenso
Dor abdominal () leve () moderado () intenso	Dor abdominal () leve () moderado () intenso
Dor hipocôndrios () leve () moderado () intenso	Dor hipocôndrios () leve () moderado () intenso
Náuseas () leve () moderado () intenso	Náuseas () leve () moderado () intenso
Vômitos () leve () moderado () intenso	Vômitos () leve () moderado () intenso
Mialgia () leve () moderado () intenso	Mialgia () leve () moderado () intenso
Artralgia () leve () moderado () intenso	Artralgia () leve () moderado () intenso
Lombalgia () leve () moderado () intenso	Lombalgia () leve () moderado () intenso
Diarreia () leve () moderado () intenso	Diarreia () leve () moderado () intenso
Tontura () leve () moderado () intenso	Tontura () leve () moderado () intenso
Outro sintoma () leve () moderado () intenso	Outro sintoma () leve () moderado () intenso
Qual?	Qual?

Em que ordem os sintomas apareceram primeiro? _____
Uso antimalárico nos últimos 30d? () Sim () Não. Se sim, qual? _____

EXAME LABORATORIAL

MATERIAL COLETADO: _____
GOTA ESPESSA: () Sim () Não Data: _____ Resultado: _____
PCR: () Sim () Não Data: _____ Resultado: _____
Hb: () Sim () Não Data: _____ Resultado: _____
Outros: _____

PROJETO: "PERFIL DE CÉLULAS B DE MEMÓRIA E DE CÉLULAS B REGULADORAS (BREG) OBSERVADAS DURANTE E APÓS A INFECÇÃO MALÁRICA HUMANA POR *P. falciparum* e *P. vivax*: IMPLICAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DE IMUNIDADE"

FICHA INDIVIDUAL DE ACOMPANHAMENTO

DATA: __/__/__

DADOS PESSOAIS:

ID: ___ NOME: _____ APELIDO: _____

RAMAL: _____ LOCALIDADE: _____

ENTREVISTADOR: _____

VISITA: ()30D ()60D ()240D

DESLOCAMENTOS DESDE A ÚLTIMA VISITA (__/__/__):

MÊS	DIAS FORA DA ÁREA	LOCALIDADE	NOTA

MALÁRIA DESDE A ÚLTIMA VISITA:

DIA/MÊS	ESPÉCIE	PARASITEMIA	TRATAMENTO

DADOS CLÍNICOS:

SINTOMAS NO ÚLTIMO MÊS:

TEVE SINTOMAS NOS ÚLTIMOS 30D? ()Sim ()Não

TEVE SINTOMAS NOS ÚLTIMOS 7D? ()Sim ()Não

Início dos sintomas: _____ Parou há qtos dias? _____

Sintomas apresentados nos últimos 30d	Sintomas apresentados nos últimos 7d
Febre ()leve ()moderado ()intenso	Febre ()leve ()moderado ()intenso
Calafrios ()leve ()moderado ()intenso	Calafrios ()leve ()moderado ()intenso
Sudorese ()leve ()moderado ()intenso	Sudorese ()leve ()moderado ()intenso
Fraqueza ()leve ()moderado ()intenso	Fraqueza ()leve ()moderado ()intenso
Cefaleia ()leve ()moderado ()intenso	Cefaleia ()leve ()moderado ()intenso
Perda apetite ()leve ()moderado ()intenso	Perda apetite ()leve ()moderado ()intenso
Dor abdominal ()leve ()moderado ()intenso	Dor abdominal ()leve ()moderado ()intenso
Dor hipocôndrios ()leve ()moderado ()intenso	Dor hipocôndrios ()leve ()moderado ()intenso
Náuseas ()leve ()moderado ()intenso	Náuseas ()leve ()moderado ()intenso
Vômitos ()leve ()moderado ()intenso	Vômitos ()leve ()moderado ()intenso
Mialgia ()leve ()moderado ()intenso	Mialgia ()leve ()moderado ()intenso
Artralgia ()leve ()moderado ()intenso	Artralgia ()leve ()moderado ()intenso
Lombalgia ()leve ()moderado ()intenso	Lombalgia ()leve ()moderado ()intenso
Diarreia ()leve ()moderado ()intenso	Diarreia ()leve ()moderado ()intenso
Tontura ()leve ()moderado ()intenso	Tontura ()leve ()moderado ()intenso
Outro sintoma ()leve ()moderado ()intenso	Outro sintoma ()leve ()moderado ()intenso
Qual?	Qual?

Em que ordem os sintomas apareceram primeiro? _____

Usou antimalárico nos últimos 30d? ()Sim ()Não Se sim, qual? _____

EXAME LABORATORIAL

MATERIAL COLETADO: _____

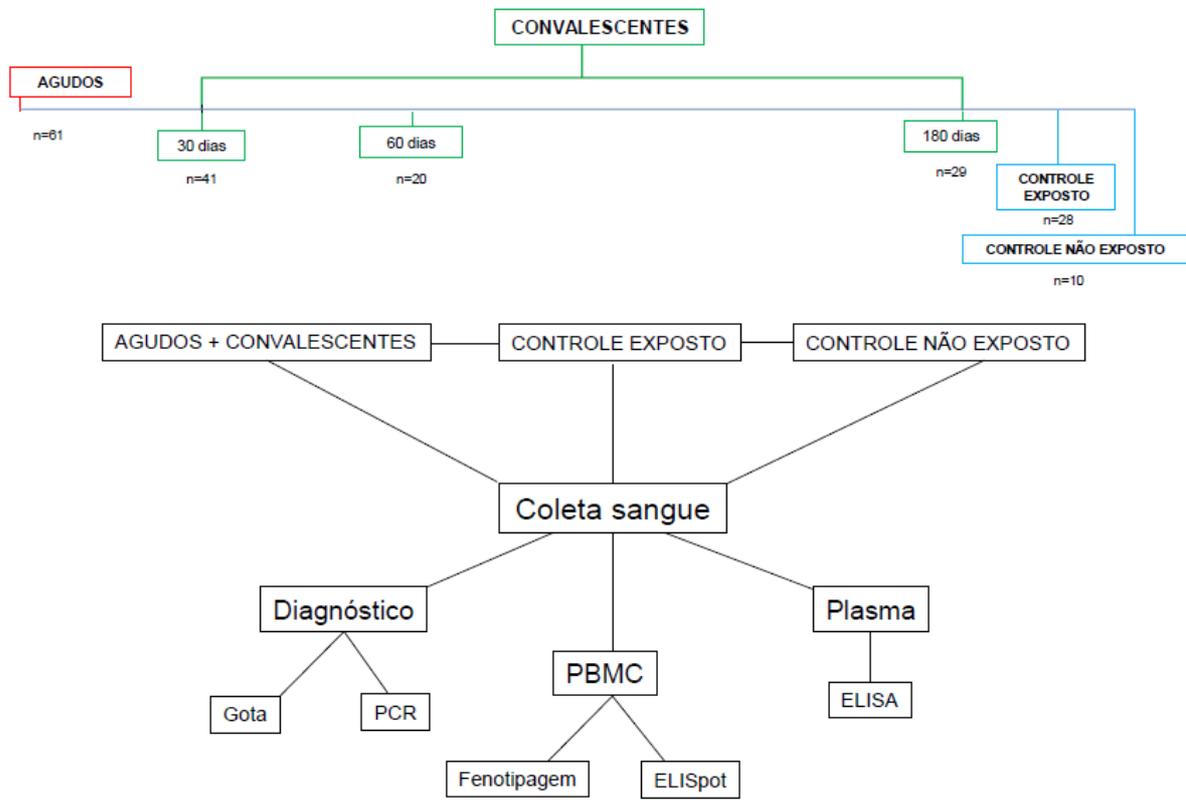
GOTA ESPESSA: ()Sim ()Não Data: _____ Resultado: _____

PCR: ()Sim ()Não Data: _____ Resultado: _____

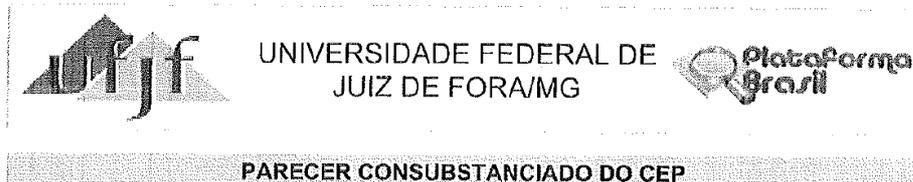
Hb: ()Sim ()Não Data: _____ Resultado: _____

Outros: _____

ANEXO D - Delineamento experimental



ANEXO E – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas (CEP/UFJF)



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Modulação da memória imunológica na infecção malárica: estudo fenotípico e funcional de distintas populações de células B em indivíduos expostos na Amazônia Brasileira

Pesquisador: Kezia Katiani Gorza Scopel

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12649213.3.0000.5147

Instituição Proponente: Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia/UFJF

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 362.875

Data da Relatoria: 08/08/2013

Apresentação do Projeto:

Apresentação do projeto esta clara e detalhada de forma objetiva. Descreve as bases científicas que justificam o estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Apresenta clareza e compatibilidade com a proposta de estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco que o projeto apresenta é caracterizado como risco mínimo, considerando que os indivíduos não sofrerão qualquer dano ou sofrerão prejuízo pela participação ou pela negação de participação na pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo em sua metodologia de forma clara e objetiva, e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto está em configuração adequada e há apresentação de declaração de infraestrutura e de

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO **CEP:** 36.036-900
UF: MG **Município:** JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
JUIZ DE FORA/MG



Continuação do Parecer: 362.875

concordância com a realização da pesquisa, assinada pelo responsável da instituição onde será realizada a pesquisa. Apresentou de forma adequada o termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O Pesquisador apresenta titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS, segundo este relator, aguardando a análise do Colegiado. Data prevista para o término da pesquisa: 31/12/2016

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

JUIZ DE FORA, 16 de Agosto de 2013

Assinador por:
Paulo Cortes Gago
(Coordenador)

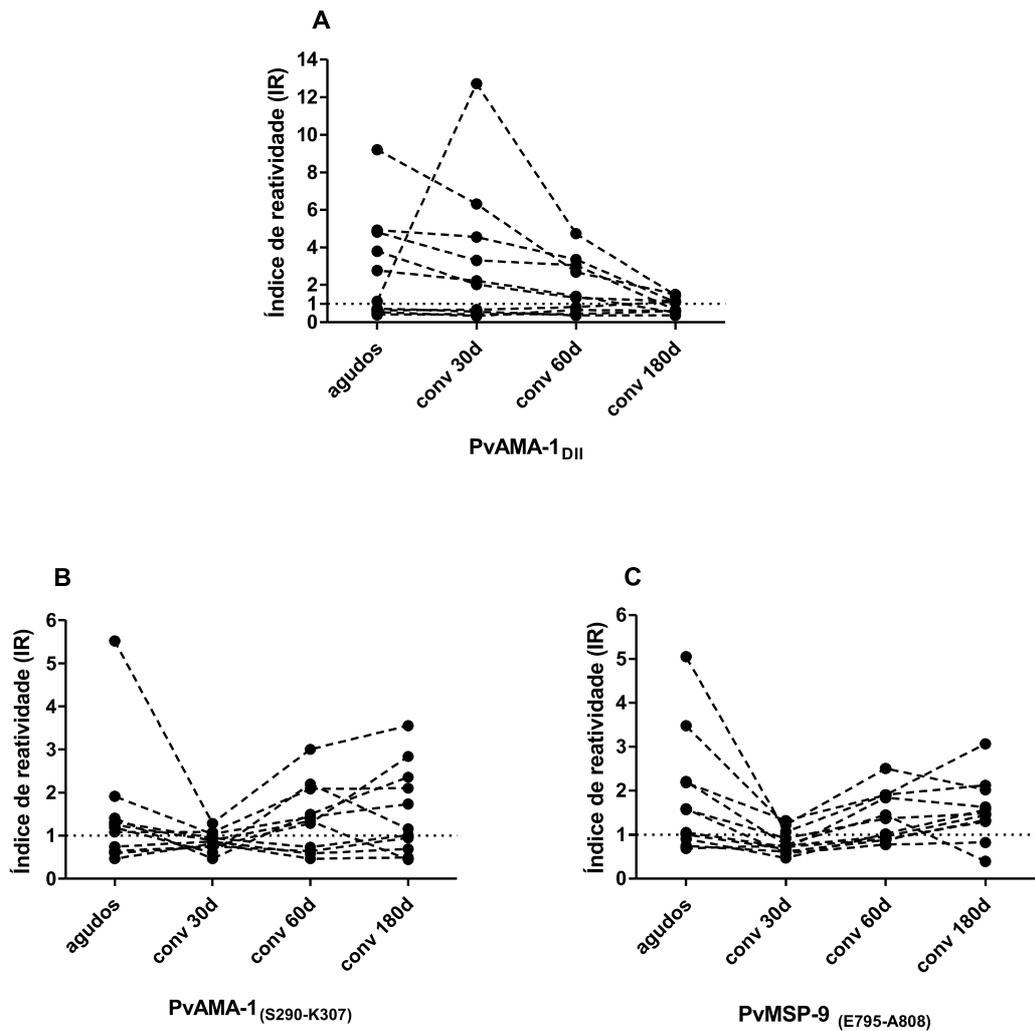
Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N
Bairro: SAO PEDRO CEP: 36.036-900
UF: MG Município: JUIZ DE FORA
Telefone: (32)2102-3786 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

ANEXO F – Perfil das respostas de anticorpos de MBCs aos antígenos de *P. vivax* em amostras de fase aguda, convalescentes de 60 (“conv 60d”), 180 dias (“conv 180d”) e controlos expostos (CE).

ID*	Tipo	^{a)} Anos de exposição à malária	^{a)} Número de malarrias prévias	^{a)} Episódios progressos de malária (espécies)	^{a)} Tempo decorrido desde última malária (anos)	AMA-1 Ac (ELISA)	AMA-1 MBC (ELISpot)
1	conv 60d	26	15	<i>P.v.;P.f.</i>	2		x
	conv 180d						x
2	agudo	33	3	<i>P.v.</i>	12	x	
	conv 180d						x
3	conv 60d	30	1	<i>P.v.</i>	27	ND	
	conv 180d						
4	agudo	12	2	<i>P.v.</i>	2		
	conv 60d						X
5	agudo	64		<i>P.v.;P.f.</i>	17	X	
	conv 180d						X
6	conv 60d	20	3	<i>P.v.</i>	17	X	
	conv 180d						X
7	agudo	18	4	<i>P.v.</i>	2	x	
	conv 60d						x
	conv 180d						x
8	agudo	50	3	<i>P.v.</i>	28		X
	conv 60d						X
9	agudo	12	0	NA	NA	x	X
	conv 180d						ND
10	agudo	29	3	<i>P.v.</i>	16		X
	conv 60d						
11	agudo	22	0	NA	NA		X
	conv 60d						X
	conv 180d						
12	agudo	25	6	<i>P.v.;P.f.</i>	6	X	
	conv 60d						X
13	conv 60d	24	0	NA	NA		
	conv 180d						X
14	agudo	7	ND	ND	4	X	
	conv 60d						X
	conv 180d						X
15	agudo	29	0	NA	NA		
	conv 60d						X
	conv 180d						
16	agudo	54	3	<i>P.v.</i>	6		
	conv 60d						X
	conv 180d						X
17	agudo	22	0	NA	NA		
	conv 180d						X
18	agudo	40	4	<i>P.v.;P.f.</i>	4	X	X
	conv 180d						
19	agudo	22	2	<i>P.v.</i>	ND	X	X
	conv 180d						X
20	agudo	43	2	<i>P.v.</i>	20		X
	conv 180d						
21	agudo	13	0	NA	NA	X	X
	conv 180d						X
22	agudo	17	0	NA	NA		
	conv 180d						ND
1	CE	8	0	NA	NA	X	X
2	CE	44	0	NA	NA	X	X
3	CE	27	0	NA	NA	X	X
4	CE	34	0	NA	NA	X	X
5	CE	40	5	<i>P.v.;P.f.</i>	9	X	X
6	CE	34	5 a 10	<i>P.v.;P.f.</i>	13	X	X
7	CE	37	>20	<i>P.v.;P.f.</i>	20		
8	CE	30	1	<i>P.v.</i>	4		
9	CE	33	10	<i>P.v.;P.f.</i>	6	X	X
10	CE	60	6	<i>P.v.</i>	17	X	X
11	CE	44	6	<i>P.v.;P.f.</i>	20		ND
12	CE	21	2	<i>P.v.;P.f.</i>	9	X	X

^{a)}Informações auto declaradas; X indica resposta positiva ao respectivo antígeno; ND = não determinado, dado não disponível; NA = Não se aplica.

ANEXO G - Mudanças temporais no índice de reatividade (IR) de IgGs específicas para PvAMA-1_{DII}, PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808)



Mudanças temporais no índice de reatividade (IR) de IgGs específicas para PvAMA-1_{DII} (A), PvAMA-1_(S290-K307) (B) e PvMSP-9_(E795-A808) (C) no plasma dos indivíduos durante o seguimento (agudo, conv30, conv60 e conv 180d, n = 10 para PvAMA-1_{DII} e n = 11 para PvAMA-1_(S290-K307) e PvMSP-9_(E795-A808)). Cada linha pontilhada conectando distintos pontos representa um indivíduo. Cada amostra plasmática foi testada em duplicata pelo ELISA. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas pelo teste pareado de Friedman.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Menção honrosa referente aos resultados da “Parte 2”



DECLARAÇÃO

Declaramos, a quem possa interessar, que o trabalho intitulado “**INDIVIDUALS LIVING IN LOW ENDEMICITY AREAS TO MALARIA IN THE BRAZILIAN AMAZON EXHIBIT LONG-LIVED ANTIBODIES AND SPECIFIC MEMORY B-CELLS TO PLASMODIUM VIVAX STAGE ANTIGENS (AMA-1 AND MSP-9).**” (**HP 076**), de autoria de ROBERTA REIS SOARES; JOSUÉ; DA COSTA LIMA-JÚNIOR; RODRIGO NUNES RODRIGUES-DA-SILVA; ROGÉRIO LAURIA DA SILVA; CLÓVIS RYUICHI NAKAIE e KÉZIA KATIANI GORZA SCOPEL, UFJF; IOC/FIOCRUZ; UNIFESP concorreu ao **Prêmio Zigmar Brener** de melhores painéis científicos, realizado durante a XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia / XLIII Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas no período de 7 a 9 de novembro de 2016 e recebeu menção honrosa pela apresentação.

Caxambu, 9 de novembro de 2016


Renata R. Tonelli
Secretária

APÊNDICE B – Artigo publicado

PATHOGENS AND GLOBAL HEALTH, 2017
<http://dx.doi.org/10.1080/20477724.2017.1308902>



What do we know about the role of regulatory B cells (Breg) during the course of infection of two major parasitic diseases, malaria and leishmaniasis?

Roberta Reis Soares, Luciana Maria Ribeiro Antinarelli, Clarice Abramo, Gilson Costa Macedo , Elaine Soares Coimbra and Kézia Katiani Gorza Scopel

Departement of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de fora, Brazil

ABSTRACT

Parasitic diseases, such as malaria and leishmaniasis, are relevant public health problems worldwide. For both diseases, the alarming number of clinical cases and deaths reported annually has justified the incentives directed to better understanding of host's factors associated with susceptibility to infection or protection. In this context, over recent years, some studies have given special attention to B lymphocytes with a regulator phenotype, known as Breg cells. Essentially important in the maintenance of immunological tolerance, especially in autoimmune disease models such as rheumatoid arthritis and experimentally induced autoimmune encephalomyelitis, the function of these lymphocytes has so far been poorly explored during the course of diseases caused by parasites. As the activation of Breg cells has been proposed as a possible therapeutic or vaccine strategy against several diseases, here we reviewed studies focused on understanding the relation of parasite and Breg cells in malaria and leishmaniasis, and the possible implications of these strategies in the course of both infections.

KEYWORDS

B regulatory cells; malaria; leishmaniasis; immunity; immunomodulation; protozoan infections; cytokines; immunological tolerance

Introduction

B cells, phenotypically characterized by CD19 expression, are divided into B1 and B2. Subsequently, B1 cells are subdivided into B1a (expressing CD5 on surface) and B1b (not expressing CD5), and B2 cells are subdivided into immature transitional cells (T1, T2, and T3), follicular B cells (FO), and marginal zone (MZ) B cells. While B1 cells originate from fetal liver precursors and are enriched in mucosal tissues and pleural and peritoneal cavities, B2 cells originate from bone marrow-derived precursors and are enriched in secondary lymphoid organs [1,2]. B1 and MZ B are considered important components of innate immunity because of their ability to respond rapidly to inflammatory and non-protein antigenic stimulus besides differentiating into short-lived extra follicular plasma cells. FO B cells are a major component of adaptive immune response and exhibit the ability to differentiate into short-lived plasma cells or enter into the germinal center where it may undergo class switch and affinity maturation. FO B cells that exit the germinal center are named long-lived or memory B cells [1,3].

In addition to their function as antibody producing and antigen presenting cells [4–8], B cells have been described as being able to perform other immune functions such as modulation of cytokine production and maintenance of immunological tolerance [9,10].

Specifically, the maintenance of immunological tolerance has been attributed to a heterogeneous B cells subset termed regulatory B cells (Breg), which were originally characterized in autoimmunity and inflammation models [11–16]. Thus far, B cells subsets identified into the B1a (B10 cells-CD19⁺CD5⁺CD1d^{hi}) [14,17,18], MZ (CD19⁺CD21^{hi}CD23⁺CD24^{hi}IgD^{lo}IgM^{hi}CD1d^{hi}) [19–21], and MZP B (T2-MZP-CD19⁺CD21^{hi}CD23^{hi}CD24^{hi}IgD^{hi}IgM^{hi}CD1d^{hi}) [22–24] lineages have been described in mice as being able to exert regulator/suppressive functions. In humans, Breg cells have been characterized into memory B subsets that exhibit CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ (B10 cells related) and CD19⁺IgM⁺CD27⁺ phenotypes [25,26] and into immature transitional B cells (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) [27,28]. In addition, plasma cells (CD138⁺MHCII^{lo}B220⁺) and Tim1⁺ B cells (Tim1⁺CD19⁺) isolated from mice and plasmablasts (CD138⁺CD44⁺ and CD19⁺CD24⁺CD27⁺) isolated from both mice and humans are still described as being able to exercise immunoregulatory functions [29–31]. Thus, it is probable that many B cell types can differentiate into a Breg cell through mechanisms such as inflammatory signals and receptor-antigen binding interaction [16]. Although Breg cells express several surface markers, which can be commonly shared by distinct cell subpopulations during the course of various diseases (Figure 1), [6,21,22,25] a precise transcription factor able

CONTACT Kézia Katiani Gorza Scopel  keziascopel@yahoo.com.br, kezia.scopel@ufjf.edu.br

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

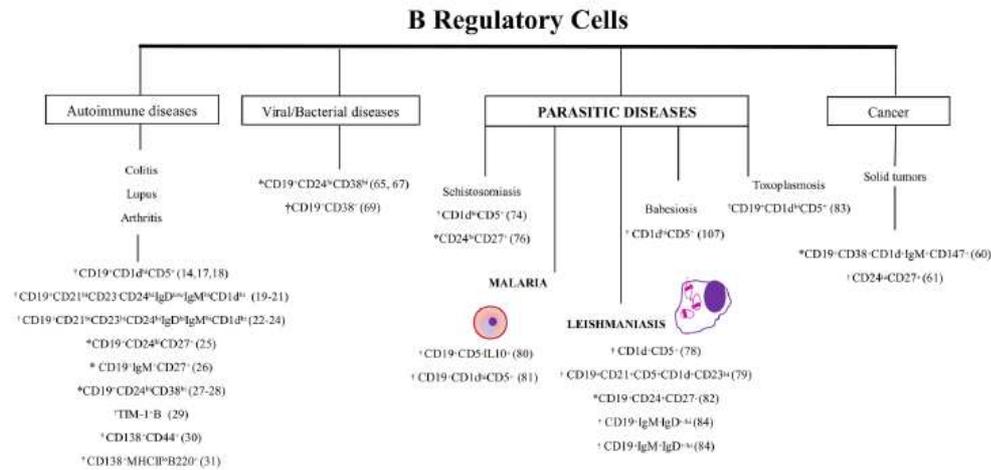


Figure 1. Phenotypic profile of Breg cells described in autoimmune, viral/bacterial, parasitic diseases and cancer. Note: Breg population described in: *humans; †experimental model; *humans and experimental model.

to define this B cells subset remains unknown. Several studies conducted in mice and humans have, therefore, attributed their suppressive role to the capacity to produce IL-10 [6,22,32–36], but there is evidence that TGF- β and IL-35–producing murine B cells also exercise regulatory functions [6,31,37–40].

The factors/mediators driving the induction of Breg cells remain to be completely clarified. However, in murine model, B10 cells appear to be induced *in vivo* and *in vitro* by B cell-activating factor (BAFF), an important member of tumor necrosis factor (TNF) family cytokines and a regulator for B cell maturation and survival [41]. In fact, paradoxical effects have been attributed to BAFF on mouse B cells: expanding Breg but also sustaining the production of antibodies able to exercise pathogenic function. During multiple sclerosis (MS), BAFF expression is strongly upregulated in the brain where enrichment of B cells subsets and/or follicles have been noted [42,43], which possibly support the production of pathogenic antibodies [44]. However, clinical trials have shown that BAFF blocking worsens the disease prognosis possibly due to inhibition of Breg induction [45]. In a similar manner, during collagen-induced arthritis (CIA), BAFF–induced Breg cells seem to be essential to avoid disease development and progression by IL-10 production [41]. On the other hand, the blocking of BAFF appeared to ameliorate disease symptoms in some cases of systemic lupus erythematosus (SLE) [46] and rheumatoid arthritis (RA) [47,48].

The mechanisms by which B cells are activated to exercise their regulatory effects may occur through distinct stimulus and mediators, some of them perhaps still unknown [49]. In mice and humans, the efficient function of Breg cells appears to be significantly influenced by B cell receptor (BCR), CD40–CD40L interaction, and

TLR (Toll Like Receptors) activation besides interaction between others costimulatory molecules such as CD80/CD86–CD152 [21,22,50]. In this context, the production of IL-10, reflecting the activation of human B10 cells, substantially increases following CD40–CD40L interaction and activation of TLR by microbial components [51], whereas the binding of antigens to BCR reduces the production of this cytokine [49]. In mice, the activation of TLR4 and TLR9 is described as an important event able to efficiently suppress the progression of diabetes, EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis), and arthritis [22]. However, this effect appears to require still a coordinate interaction among others costimulatory molecules because B cells restrict CD40 deficiency are associated with development of EAE [13,52]. Interestingly, in this same autoimmune disease model, the Breg cell activation still requires signalization through BCR since in the absence of CD19 (co-receptor that optimizes BCR signal) the animals develop severe clinical condition [17,53]. Since Breg cells are activated for distinct signals including TLR, it is important to consider that distinct compounds/products may trigger different B cell targets [54] and, thus, differently modulate their immune regulatory capacity; for example, while TLR4 (expressed on murine B1, MZ, and memory B cells but absent on majority of human B cells) is triggered by lipopolysaccharides (LPS) [54, 55], TLR1/6, TLR2, TLR7, and TLR9, present in murine and humans B cells, are activated by bacterial lipopeptides, peptidoglycans, CpG DNA motifs, and single-stranded RNA, respectively [56]. Furthermore, is notable that sensitivity to TLR activation and expression levels of TLR 6, 7, and 9 is more elevated in memory B cells in comparison with circulating naïve B cells [55]. Since Breg cells have been associated with prevention or increased disposition to immune system-related

diseases, infectious and/or cancerous, they have become appealing targets for therapeutic intervention. Despite the fact that in recent years many compounds have been developed to target TLRs for either stimulating or antagonizing their activity [57], questions like the consequences of induction of Breg cells by TLR agonists or antagonists in the host cells with respect to development of diseases like cancer and bacterial or viral infection first need to be addressed. Furthermore, it remains to be elucidated whether blocking or activation of TLR as a therapy negatively or positively affects essential functions performed by other cells amongst many other issues.

Insights about the role of Breg cells in the course of infectious and non-infectious diseases

Breg cells play a protective role in autoimmune settings such as allergy, RA, SLE, MS, and EAE, where the strong proinflammatory Th1 and/or Th17 profile displays serious deleterious effects in affected individuals [58,59]. However, therapeutic inhibition of Breg cells can have beneficial effects in the control of others diseases such as cancer and viral and bacterial infections. In breast, cervical, and ovarian human carcinoma, Breg cells, phenotypically described as CD19⁺CD38⁺CD1d⁺IgM⁺CD147⁺ (or GrB⁺ Bregs), have been observed within the tumor microenvironment possibly contributing to increase in relative tumor volume [60]. In human chronic lymphocytic leukemia (CLL) CD24^{hi}CD27⁺ cells appear to contribute to general immune suppression of patients through IL-10 secretion and thereby toward disease progression [8,60–63]. Really, Inoue and collaborators (2006) showed that B-cell-deficient mice are able to control or eliminate the tumor growth through IFN- γ , whereas the cancer evolution may be observed in wild type animals [64].

Deleterious effects of Breg cells are also observed in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus (HBV), where T cell responses are essential for antiviral defense [65–67]. Studies, conducted *in vitro* and/or *in vivo*, have demonstrated that IL-10 produced by Breg cells act to promote dysfunction of disease-specific CD8⁺ T cells that favor a higher viral load [66, 67] and inflammation [65]. In fact, Breg cells depletion *in vitro* restores HBV-specific CD8 T cells responses, suggesting the important role of Bregs to the development of viral load during infections [65]. Relative to bacterial infections, B cells are activated to produce immunoregulatory cytokines following engagement of bacterial LPS with TLR (TLR2, 4, 5, 7/8, and 9) expressed on cellular surface [68]. In a salmonellosis murine model, deletion of the TLR adaptor molecule myeloid differentiation primary response protein 88 (Myd88), or TLR2 and TLR4 exclusively in B cells leads to decreased secretion of IL-10 by B cells making the mice more resistant to *Salmonella typhimurium* infection [68,69]. In a similar fashion, reduction in the levels of IL-10 in B cell-deficient

mice were associated to an efficient control of infection caused by *Brucella abortus* [70].

While studies investigating the relation among Breg cells and occurrence of autoimmune and viral diseases are in constant development, the phenotypic description and immunomodulatory/immunoregulatory function of these cells remains poorly investigated during parasitic infections [68]. In helminth infections, the role of Breg cells has been investigated particularly during schistosomiasis [71–76]. CD5⁺ B1 cells seem to be elevated in the peritoneal cavity during the first 5 weeks of experimental infection with *Schistosoma mansoni* and are associated with lacto-N-fucopentaose III, a component of schistosoma egg antigen [71, 77]. These cells appear to limit pathological infection as B1 cell-deficient animals clearly display a higher susceptibility to *S. mansoni* infection, as evidenced through increase in the tissue egg load, granuloma density, and elevated mortality [72]. The elevation of CD24^{hi}CD27⁺ and CD1d^{hi}CD5⁺ Breg cells following murine and human schistosomiasis have also been observed, but the consequences of this observation in terms of immunomodulation were measured particularly in allergic disorders. During *S. mansoni* infection, IL-10 produced by B cells suppressed Th2-mediated severe allergic reactions, namely, anaphylaxis and allergic airway inflammation [73, 74, 76].

Relative to protozoan parasites, still are rare the studies that investigate the role of Breg during the course of infection, but there is evidences that this B cell subtype is critically important in immune homeostasis [78–84]. In this context, Jeong and collaborators demonstrated that IL-10-producing CD1d^{hi}CD5⁺ Breg cells are induced by products that are secreted by fully replicated tachyzoites and are essential to the chronicity of infection in *Toxoplasma gondii* murine model [83]. Considering that malaria and leishmaniasis, secular diseases caused by protozoans, remain two important causes of morbidity and/or mortality worldwide, insights into the role of Breg cells could provide the development of new therapeutic and vaccine strategies. Therefore, we reviewed and investigated major advances relative to understanding the role of this subset of B cells in the regulation of immune responses and immunopathology during both malaria and leishmaniasis [85].

Occurrence of Breg cells during malaria

Malaria, a parasitic disease caused by protozoa of the *Plasmodium* genus, is a public health concern worldwide. In the last year, around 214 million clinical cases and 438,000 deaths occurred in tropical and subtropical regions of the globe, with children under five years old and pregnant women being the main target of infection [86]. In general, deaths are primarily due to important clinical syndromes, including neuronal disorders caused as a result of sequestration of infected red blood

cells in brain microvessels induced by parasites [87,88]. However, proinflammatory cytokines and other mediators produced during malaria seem to be critical in its pathology, activating and recruiting cytotoxic cells for the infection site [89, 90]. During these pathologic processes, regulatory cells and antiinflammatory cytokines (such as IL-10) are suggested to be important for preventing clinical evolution of malarial neuropathology [80, 81].

Despite the absence of studies directly investigating the regulatory effects of B cells during human malaria, increased BAFF levels and an increase in circulating CD10⁺ B cells have been observed in subjects reporting uncomplicated malaria [91–93]. As CD10⁺ B cells may indirectly include BAFF-induced CD10⁺ Breg cells, it is possible to suggest that Breg cells may be responsible for establishment of parasite–host equilibrium [41, 94, 95].

Specifically, the relationship between IL-10–producing Breg cells and malarial infection has been investigated only in the experimental model of cerebral malaria (ECM) caused by *P. berghei* ANKA (*PbA*) [80, 81]. ECM associated with *PbA* infection involves similar mechanisms to those observed during human cerebral malaria, which is characterized by massive destruction of erythrocytes and release of proinflammatory cytokines and mediators such as TNF- α , lymphotoxin, IL-1, and IL-6, inducing activation and recruitment of natural killer cells (NK) and cytotoxic CD8⁺ cells in brain blood vessels and upregulation of adhesion molecules in the vascular endothelium. Together, these factors determine leukocyte and infected red blood cell (pRBC) accumulation in microvessels of the brain and lungs, resulting in the death of mice [87, 96–98]. Recently, Liu and colleagues [81] showed that the adoptive transfer of IL-10⁺ Breg cells, but not Treg cells (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), to *PbA*-infected mice was associated with reduced accumulation of NK and CD8⁺ T cells and hemorrhage in brain tissue, improving the survival rate of the animal. However, parasitemia levels were not altered by the presence or absence of these cells. In addition, the study showed that treatment of Breg cell-recipient mice with anti-IL-10 monoclonal antibodies blocked the protective effect of Breg cells. In summary, Breg cells may selectively exert regulatory effects on the immunopathology of malaria by IL-10 production but appear to have little impact against blood parasitemia development [81]. Using the same model of cerebral malaria, Bao and collaborators [80] showed that Breg cells, characterized by simultaneous expression of CD19⁺CD5⁻IL10⁺ markers, appear to be the main source of plasma IL-10 production and are able to protect the animals from mortality when they are adoptively transferred to naïve mice. Thereby, this study diverges from others, which appoint B1a cells as major sources of IL-10 [14, 15, 17, 18, 99, 100]. Of interest, CD5 is a pan T cell marker being few expressed on B cells. While in mice CD5 expression characterizes B1a lineage [101] into human B cells this marker does not define a specific B

cell subset being expressed on B1-like cells, immature B cells, transitional B cells, and pre-naïve B cells [102–104]. Importantly, Breg cells have been described within both B cell lineages, denoting the importance of CD5 as a possible ‘indicator’ of regulatory activity. The role of CD5 as an immunoregulatory molecule appears to be mediated by its inhibiting capacity of both BCR and TCR activation after binding with these receptors. This bond increases the threshold required to activate a B cell or a T cell and renders it tolerant to its cognate antigens [105]. CD5 may also act by enhancing the production of IL-10 through stimulation of the cytokine gene promoter as demonstrated by Gary-Gouy and colleagues [106]. In this study, the author demonstrated that CD5 transfection for Daudi B cells (CD5⁻) upregulated several genes, including those belonging to the IL-10 family. However, the ability to produce IL-10 and/or mediate immunoregulatory functions is not restricted to CD5⁺ cells as noted in previous studies [63, 107].

While the expansion/activation of Breg cells resulting in the production of higher IL-10 levels seems to be essential for preventing cerebral malaria in mice infected with *PbA*, in the murine infection caused by *Babesia microti*, a *Plasmodium*-related apicomplexan parasite, such factors appear to contribute toward enhanced growth and survival of the parasite [80, 81, 108]. In fact, the transfer of IL-10-producing CD19^{hi}CD5⁺ Breg cells isolated from *B. microti*-infected mice allowed the development of high levels of circulating parasitemia on infected recipient mice, whereas B cell-deficient mice were able to control the infection [108]. Thus, it is evident that immune factor–pathogen interactions observed between parasite and host are not easily extrapolated to related species.

Despite two studies highlighting the beneficial role of Breg cells during severe malaria through the inhibition of exacerbated inflammatory responses, it is important to investigate the occurrence and implications of Breg cells during uncomplicated and complicated human malaria and related diseases.

Breg cells and leishmaniasis infection

Human leishmaniasis, usually classified as cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL), and visceral leishmaniasis (VL), is caused by over 20 species of the genus *Leishmania* [109]. Recent estimates indicate that around 14 million people are infected worldwide, with an annual incidence of 1.3 million new cases and 20,000 deaths per year related to VL [110], a systemic disease characterized by parasitism of the spleen, liver, and bone marrow [111, 112]. CL is the most prevalent form, characterized by the development of an ulcerative self-healing skin lesion; MCL is a severe and chronic infection causing diffuse lesions that may even spread to mucosal tissues [113, 114]. These clinical manifestations are, generally, not lethal but result in disfigurement and disability, resulting in societal stigma

and marginalization, particularly for women. VL or kala-azar is the most severe leishmaniasis form, characterized by systemic parasitism, and may be fatal if not treated [111, 112].

The contribution of B cells in human leishmaniasis pathogenesis is controversial [115, 116]. Various studies have demonstrated that B cells play a negative role in experimental models of leishmaniasis by contributing toward increased susceptibility of infection by producing polyclonal antibodies [117–120] and/or immunosuppressive cytokines such as IL-10 secreted by regulatory or non-regulatory B cells [78, 119–121]. In human infections, a high titer of *Leishmania*-specific antibodies are observed in patients with a more severe clinical form of the cutaneous disease, diffuse cutaneous leishmaniasis [122, 123], and in patients with VL [117, 124], whereas patients with self-healing localized cutaneous leishmaniasis lack *Leishmania*-specific antibodies or elicit a very weak response [116]. On the other hand, B cells appear to play a protective role in disease pathogenesis, as observed in high prevalence of seropositive healthy individuals in areas endemic for VL [116, 125] and longer persistence of antibodies against *Leishmania* (≥ 15 years) after the infection has been cured [116, 126, 127].

The immunosuppressive role of B cells observed during leishmaniasis appears to be conditioned, at least in part, to generation of Breg cells [78, 79, 82, 84]. In the context of CL, a single study using murine models has demonstrated that Breg cells are required for enhanced susceptibility to infection in several *Leishmania* species [78]. In a similar manner, Ronet and collaborators [78] reported that IL-10 secreted by CD1d⁺CD5⁺ Breg cells is associated with a more severe disease in *L. major* BALB/c mice as a result of an immune response polarized for Th2 profile. Regarding VL, a recent *in vitro* study showed that human B cells exposed to *L. infantum* amastigotes exhibited a regulator phenotype (CD19⁺CD24⁺CD27⁻) and higher capacity to produce IL-10. In addition, the activation, function, and proliferation of CD4⁺ T cells were inhibited after contact with conditioned media from B cells incubated with *L. infantum* amastigotes, suggesting regulatory activity of B cells mediated by IL-10 [82]. In mice, using a similar methodology, Bankoti and collaborators [79] identified CD19⁺CD21⁺CD5⁺CD1d⁺CD23^{hi} B cells, a phenotype that has been associated with Breg cells in hypersensitivity models [17]. These cells were activated to produce high IL-10 levels after stimulation of B cells with *L. donovani* amastigotes and CpG in a MyD88-dependent manner. Another study conducted in canines infected with VL pointed, recently, to a new Breg cells subset with a regulatory function through IL-10 production. This new Breg cells subset was phenotypically described as CD19⁺IgM⁻IgD^{+/hi} or CD19⁺IgM⁺IgD^{+/hi}, and levels of these Breg cells increased at least threefold during progressive VL and were critical for suppressing Th1 cell effector function through interaction of B cells

and PDL1(programmed death–ligand 1/receptor) [84]. Similar data were obtained in a RA model where pathogenic B cells were observed only when they expressed IgM together with IgD but not when IgM was expressed alone [128]. Since IgM⁺IgD⁺ and IgM only, together with the others distinctive marker, represent different subsets (naïve vs. non-switch memory B-cells), they might produce different cytokines and exert distinct regulatory functions. Even expressed simultaneously, IgM and IgD are involved in different surface clusters and signal independently [129]. Of interest, during development in the bone marrow, mlg (membrane immunoglobulin) is restricted to the IgM isotype; however, as soon as the B cell exits the bone marrow to populate peripheral lymphoid organs, it starts to express surface IgD. This event can occur primarily by two distinct mechanisms, alternative splicing and CSR (class switch recombination), but intriguingly, BCR-dependent functions such as activation, receptor desensitization, apoptosis induction, and immunological tolerance are induced by either of the two isotypes or by both isotypes in combination what makes its function still more enigmatic (for more information about B cell class switch we recommended the paper by Geisberger and colleagues) [130].

IL-10 can be produced by innate cells such as macrophages, NK cells, dendritic cells (DCs), and multiple adaptive T and B cells [117, 120]. Importantly, the evidence shown above suggests that this cytokine secreted by B cells, particularly by Breg cells, can play a decisive role in progressive decline of the immune system of human patients with VL and lead to a fatal outcome in untreated cases [82, 131, 132]. Accordingly, the inhibition or neutralization of IL-10 by blocking IL-10 receptor or using anti-IL-10 monoclonal antibodies that allow improved immune response and parasite killing both in mouse and human VL infections may be a good strategy to control infection [117, 133–136].

Since the effects of Breg cells have not been studied in the context of human infection, urgent studies are warranted to determine the clinical relevance of Breg induction by *Leishmania* parasites [82]. Understanding the role of Breg cells in leishmaniasis may contribute to development of future vaccines or immunotherapies, and new strategies should be developed to manipulate these cells to benefit the host [116, 131, 137].

Concluding remarks

Breg cell depletion therapy or the development of vaccines directed to their generation must be carefully evaluated. The expansion of these lymphocytes in the context of autoimmune and inflammatory diseases and ECM demonstrates a protective role, but in HIV, cancer and leishmaniasis the presence of these cells is associated with increased disease severity. As yet there are few studies focused on Breg cells, especially from human

samples; further studies are needed in order to elucidate their role, in the context of different parasitic diseases that can occur simultaneously in a specific area. Future research will help the development of new strategies to combat leishmaniasis and malaria characterized by high rates of morbidity and mortality worldwide.

Ethics approval

Ethics approval is not applicable for this review paper.

Acknowledgements

The authors thank the fellowship by 'Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior' (CAPES) (R.R. Soares and L.M.R. Antinarelli).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the 'Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais' (FAPEMIG: CBB – APQ-02315-14) and 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (CNPq: 454575/2014-9).

ORCID

Gilson Costa Macedo  <http://orcid.org/0000-0002-7206-1422>

References

- [1] Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes—key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(3):332–338.
- [2] Welner RS, Pelayo R, Kincade PW. Evolving views on the genealogy of B cells. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(2):95–106.
- [3] Borhis G, Richard Y. Subversion of the B-cell compartment during parasitic, bacterial, and viral infections. *BMC Immunol.* 2015;16(15):1–10.
- [4] DiLillo DJ, Hamaguchi Y, Ueda Y, et al. Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. *J Immunol.* 2008;180(1):361–371.
- [5] LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008;112(5):1570–1580.
- [6] Han J, Sun L, Fan X, et al. Role of regulatory B cells in neuroimmunologic disorders. *J Neurosci Res.* 2016;94(8):693–701.
- [7] Liu Y, Wu Y, Ramarathinam L, et al. Gene-targeted B-deficient mice reveal a critical role for B cells in the CD4 T cell response. *Int Immunol.* 1995;7(8):1353–1362.
- [8] Tedder TF. B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset. *J Immunol.* 2015;194(4):1395–1401.
- [9] Harris DP, Haynes L, Sayles PC, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol.* 2000;1(6):475–482.
- [10] Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(2):147–153.
- [11] Katz SI, Parker D, Turk JL. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature.* 1974;251:550–551.
- [12] Neta R, Salvin SB. Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *J Immunol.* 1974;113(6):1716–1725.
- [13] Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, et al. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 2002;3(10):944–950.
- [14] Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity.* 2002;16(2):219–230.
- [15] Mauri C, Gray D, Mushtaq N, et al. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med.* 2003;197(4):489–501.
- [16] Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity.* 2015;42(4):607–612.
- [17] Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, et al. A regulatory B cell subset with a unique CD1d^{hi}CD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity.* 2008;28(5):639–650.
- [18] DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann NY Acad Sci.* 2010;1183(2010):38–57.
- [19] Wei B, Velazquez P, Turovskaya O, et al. 2005. Mesenteric B cells centrally inhibit CD4⁺ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(6):2010–2015.
- [20] Gray M, Miles K, Salter D, et al. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(35):14080–14085.
- [21] Mauri C, Blair PA. Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(11):636–643.
- [22] Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:221–241.
- [23] Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol.* 2007;178(12):7868–7878.
- [24] Blair PA, Chavez-Rueda KA, Evans JG, et al. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol.* 2009;182(6):3492–3502.
- [25] Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 2011;117(2):530–541.
- [26] Khoder A, Sarvaria A, Alsuliman A, et al. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. *Blood.* 2014;124(13):2034–2045.
- [27] Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, et al. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic lupus erythematosus patients. *Immunity.* 2010;32(1):129–140.
- [28] Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, et al. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med.* 2013;5(173):173ra23.
- [29] Xiao S, Brooks CR, Zhu C, et al. Defect in regulatory B-cell function and development of systemic autoimmunity in T-cell Ig mucin 1 (Tim-1) mucin domain-mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(30):12105–12110.

- [30] Matsumoto M, Baba A, Yokota T, et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity*. 2014;41(6):1040–1051.
- [31] Shen P, Roch T, Lampropoulou V, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*. 2014;507(7492):366–370.
- [32] O'garra A, Chang R, Go N, et al. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol*. 1992;22(3):711–717.
- [33] Mizoguchi A, Mizoguchi E, Smith RN, et al. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor α mutant mice. *J Exp Med*. 1997;186(10):1749–1756.
- [34] Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol*. 2003;27(10):479–486.
- [35] Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol*. 2006;176(2):705–710.
- [36] Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):170–181.
- [37] Douglas RS, Woo EY, Capocasale RJ, et al. Altered response to and production of TGF- β by B cells from autoimmune NZB mice. *Cell Immunol*. 1997;179:126–137.
- [38] Wang RX, Yu CR, Dambuzza IM, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med*. 2014;20(6):633–641.
- [39] Egwuagu CE, Yu CR. Interleukin 35-producing B cells (B35-Breg): a new mediator of regulatory B-cell functions in CNS autoimmune diseases. *Crit Rev Immunol*. 2015;35(1):49–57.
- [40] Natarajan P, Singh A, McNamara JT, et al. Regulatory B cells from hilar lymph nodes of tolerant mice in a murine model of allergic airway disease are CD5⁺, express TGF- β , and co-localize with CD4⁺Foxp3⁺ T cells. *Mucosal Immunol*. 2012;5(6):691–701.
- [41] Yang M, Sun L, Wang S, et al. Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-Producing regulatory B cells. *J Immunol*. 2010;184(7):3321–3325.
- [42] Cepok S, Rosche B, Grummel V, et al. Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain*. 2005;128:1667–1676.
- [43] Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, et al. BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med*. 2005;201(2):195–200.
- [44] Hartung HP, Kieser BC. Atacicept: targeting B cells in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2010;3(4):205–216.
- [45] Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*. 2007;130(4):1089–1104.
- [46] Ramanujam M, Davidson A. BAFF blockade for systemic lupus erythematosus: will the promise be fulfilled? *Immunol Rev*. 2008;223:156–174.
- [47] Gross JA, Dillon SR, Mudri S, et al. TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease impaired B cell maturation in mice lacking BlyS. *Immunity*. 2001;15:289–302.
- [48] Wei F, Chang Y, Wei W. The role of BAFF in the progression of rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2015;76(2):537–544.
- [49] Jamin C, Morva A, Lemoine S, et al. Regulatory B lymphocytes in humans: a potential role in autoimmunity. *Arthritis Rheum*. 2008;58(7):1900–1906.
- [50] Noh G, Lee JH. Regulatory B cells and allergic diseases. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2011;3(3):168–177.
- [51] Berthelot JM, Jamin C, Amrouche K, et al. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine*. 2013;80(1):18–22.
- [52] Mauri C, Ehrenstein MR. The 'short' history of regulatory B cells. *Trends Immunol*. 2008;29(1):34–40.
- [53] Sato S, Steeber DA, Tedder TF. The CD19 signal transduction molecule is a response regulator of B-lymphocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:11558–11562.
- [54] Ma K, Li J, Fang Y, et al. Roles of B cell-intrinsic TLR signals in systemic lupus erythematosus. *Int J Mol Sci*. 2015;16(6):13084–13105.
- [55] Barr TA, Brown S, Ryan G, et al. TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(11):3040–3053.
- [56] Chiron D, Bekeredian-Ding I, Pellat-Deceunynck C, et al. Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells. *Blood*. 2008;112(6):2205–2213.
- [57] Connolly DJ, O'Neill LA. New developments in Toll-like receptor targeted therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(4):510–518.
- [58] Klinker MW, Lundy SK. Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes. *Mol Med*. 2012;18(1):123.
- [59] Yang M, Deng J, Liu Y, et al. IL-10-producing regulatory B10 cells ameliorate collagen-induced arthritis via suppressing Th17 cell generation. *Am J Pathol*. 2012;180(6):2375–2385.
- [60] Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res*. 2013;73(8):2468–2479.
- [61] DiLillo DJ, Weinberg JB, Yoshizaki A, et al. Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia*. 2013;27(1):170–182.
- [62] Candando KM, Lykken JM, Tedder TF. B10 cell regulation of health and disease. *Immunol Rev*. 2014;259(1):259–272.
- [63] Lykken JM, Candando KM, Tedder TF. Regulatory B10 cell development and function. *Int Immunol*. 2015;27(10):471–477.
- [64] Inoue S, Leitner WW, Golding B, et al. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res*. 2006;66(15):7741–7747.
- [65] Das A, Ellis G, Pallant C, et al. IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol*. 2012;189(8):3925–3935.
- [66] Siewe B, Stapleton JT, Martinson J, et al. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8⁺ T cell function *in vitro*. *J Leukoc Biol*. 2013;93(5):811–818.
- [67] Liu J, Zhan W, Kim CJ, et al. IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses. *PLoS One*. 2014;9(2):e89236.
- [68] Majlessi L, Lo-Man R, Leclerc C. Regulatory B and T cells in infections. *Microbes Infect*. 2008;10(9):1030–1035.
- [69] Neves P, Lampropoulou V, Calderon-Gomez E, et al. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity*. 2010;33(5):777–790.
- [70] Goenka R, Parent MA, Elzer PH, et al. B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus*. *J Infect Dis*. 2011;203(8):1136–1146.

- [71] Velupillai P, Secor WE, Horauf AM, et al. B-1 cell (CD5⁺B220⁺) outgrowth in murine schistosomiasis is genetically restricted and is largely due to activation by polylectosamine sugars. *J Immunol.* 1997;158(1):338–344.
- [72] Gaubert S, Viana da Costa A, Maurage CA, et al. X-linked immunodeficiency affects the outcome of *Schistosoma mansoni* infection in the murine model. *Parasite Immunol.* 1999;21(2):89–101.
- [73] Mangan NE, Fallon RE, Smith P, et al. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J Immunol.* 2004;173(10):6346–6356.
- [74] Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, et al. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(5):1114–1124.
- [75] Van der Vlugt LE, Labuda LA, Ozir-Fazalalikhhan A, et al. Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD1d(hi) B cells: inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells. *PLoS One.* 2012;7(2):e30883.
- [76] Van der Vlugt LE, Zinsou JF, Ozir-Fazalalikhhan A, et al. Interleukin 10 (IL-10) –producing CD1dhi regulatory B cells from *Schistosoma haematobium*–infected individuals induce IL-10–positive T cells and suppress effector T-cell cytokines. *J Infect Dis.* 2014;210(8):1207–1216.
- [77] Velupillai P, Harn DA. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome–infected mice: a mechanism for regulation of CD4⁺ T-cell subsets. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(1):18–22.
- [78] Ronet C, Hauyon-La Torre Y, Revaz-Breton M, et al. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with *Leishmania major* through IL-10 production. *J Immunol.* 2010;184(2):886–894.
- [79] Bankoti R, Gupta K, Levchenko A, et al. Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection. *J Immunol.* 2012;188(8):3961–3971.
- [80] Bao LQ, Huy NT, Kikuchi M, et al. CD19⁺ B cells confer protection against experimental cerebral malaria in semi-immune rodent model. *PLoS One.* 2013;8(5):e64836.
- [81] Liu Y, Chen Y, Li Z, et al. Role of IL-10–producing regulatory B cells in control of cerebral malaria in *Plasmodium berghei* infected mice. *Eur J Immunol.* 2013;43(11):2907–2918.
- [82] Andreani G, Ouellet M, Menasria R, et al. *Leishmania infantum* amastigotes trigger a subpopulation of human B cells with an immunoregulatory phenotype. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(2):e0003543.
- [83] Jeong YI, Hong SH, Choa SH, et al. Induction of IL-10–producing regulatory B cells following *Toxoplasma gondii* infection is important to the cyst formation. *Biochem Biophys Rep.* 2016;2016(7):91–97.
- [84] Schaut RG, Lamb IM, Toepp AJ, et al. Regulatory IgDhi B cells suppress T cell function via IL-10 and PD-L1 during progressive visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 2016;196(10):4100–4109.
- [85] Tate EW, Bell AS, Rackham MD, et al. N-Myristoyltransferase as a potential drug target in malaria and leishmaniasis. *Parasitology.* 2014;141(1):37–49.
- [86] World Health Organization (WHO) [Internet]. World Malaria Report 2015; 2015 [updated 2016 April 20]. Available from: <http://www.rbm.who.int>.
- [87] Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:722–735.
- [88] Riley EM, Couper KN, Helmbly H, et al. Neuropathogenesis of human and murine malaria. *Trends Parasitol.* 2010;26(6):277–278.
- [89] Clark IA, Budd AC, Alleva LM, et al. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malar J.* 2006;5(1):1.
- [90] Haque A, Best SE, Ammerdorffer A, et al. Type I interferons suppress CD4⁺ T-cell–dependent parasite control during blood–stage *Plasmodium* infection. *Eur J Immunol.* 2011;41(9):2688–2698.
- [91] Asito AS, Moormann AM, Kiprotich C, et al. Alterations on peripheral B cell subsets following an acute uncomplicated clinical malaria infection in children. *Malar J.* 2008;7(1):1–8.
- [92] Nduati E, Gwela A, Karanja H, et al. The plasma concentration of the B cell activating factor is increased in children with acute malaria. *J Infect Dis.* 2011;204(6):962–970.
- [93] Scholzen A, Teirlinck AC, Bijker EM, et al. BAFF and BAFF receptor levels correlate with B cell subset activation and redistribution in controlled human malaria infection. *J Immunol.* 2014;192(8):3719–3729.
- [94] Scholzen A, Sauerwein RW. How malaria modulates memory: activation and dysregulation of B cells in *Plasmodium* infection. *Trends Parasitol.* 2013;29(5):252–262.
- [95] Borhis G, Richard Y. Subversion of the B-cell compartment during parasitic, bacterial, and viral infections. *BMC Immunol.* 2015;16(1):1–10.
- [96] Rest JR. Cerebral malaria in inbred mice. I. A new model and its pathology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982;76(3):410–415.
- [97] Good MF, Xu H, Wykes M, et al. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:69–99.
- [98] Amante FH, Haque A, Stanley AC, et al. Immune-mediated mechanisms of parasite tissue sequestration during experimental cerebral malaria. *J Immunol.* 2010;185(6):3632–3642.
- [99] Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):391–397.
- [100] Margry B, Kersemakers SC, Hoek A, et al. Activated peritoneal cavity B-1a cells possess regulatory B cell properties. *PLoS One.* 2014;9(2):e88869.
- [101] Bismuth G, Gary-Gouy H. Signaling functions of the CD5 molecule. *Curr Trends Immunol.* 1998;1:79–87.
- [102] Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev.* 2004;197:179–191.
- [103] Lee J, Kuchen S, Fischer R, et al. Identification and characterization of a human CD5⁺ pre-naive B cell population. *J Immunol.* 2009;182(7):4116–4126.
- [104] Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁺. *J Exp Med.* 2011;208(1):67–80.
- [105] Dalloul A. CD5: a safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells. *Autoimmun Rev.* 2009;8(4):349–353.
- [106] Gary-Gouy H, Sainz-Perez A, Marteau JB, et al. Natural phosphorylation of CD5 in chronic lymphocytic leukemia B cells and analysis of CD5-regulated genes in a B cell line suggest a role for CD5 in malignant phenotype. *J Immunol.* 2007;179(7):4335–4344.

- [107] Maseda D, Candando KM, Smith SH, et al. Peritoneal cavity regulatory B cells (B10 cells) modulate IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cell numbers during colitis development in mice. *J Immunol*. 2013;191(5):2780–2795.
- [108] Jeong YI, Hong SH, Cho SH, et al. Induction of IL-10-producing CD1d^{high}CD5⁺ regulatory B cells following *Babesia microti*-infection. *PLoS One*. 2012;7(10):e46553.
- [109] Sakkas H, Gartzonika C, Levdiotou S. Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis*. 2016;53(1):8–16.
- [110] World Health Organization (WHO) [Internet] [updated 2017 March 09]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
- [111] Chappuis F, Sundar S, Hailu A, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(11):873–882.
- [112] Stanley AC, Engwerda CR. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(2):138–147.
- [113] Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(9):581–596.
- [114] Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2009;31(8):423–431.
- [115] Amezcua Vesely MC, Bermejo DA, Montes CL, et al. B-cell response during protozoan parasite infections. *J Parasitol Res*. 2012;2012:362131.
- [116] Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Front Immunol*. 2012;3(251):1–10.
- [117] Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol*. 2007;28(9):378–384.
- [118] Wanasen N, Xin L, Soong L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int J Parasitol*. 2008;38(3–4):417–429.
- [119] Deak E, Jayakumar A, Cho KW, et al. Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. *Eur J Immunol*. 2010;40(5):1355–1368.
- [120] Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, et al. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit Vectors*. 2016;9(118):1–13.
- [121] Bankoti R, Stäger S. Differential regulation of the immune response in the spleen and liver of mice infected with *Leishmania donovani*. *J Trop Med*. 2012;2012:639304.
- [122] Schurr E, Kidane K, Yemaneberhan T, et al. Cutaneous leishmaniasis in Ethiopia: I. Lymphocyte transformation and antibody titre. *Trop Med Parasitol*. 1986;37(4):403–408.
- [123] Mengistu G, Akuffo HO, Yemane-Berhan T, et al. Serum antibody specificities to *Leishmania aethiopsica* antigens in patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 1990;12(5):495–495.
- [124] Galvao-Castro B, Sá Ferreira JA, Marzochi KF, et al. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 1984;56(1):58–66.
- [125] Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(4):334–71.
- [126] Gidwani K, Picado A, Ostyn B, et al. Persistence of *Leishmania donovani* antibodies in past visceral leishmaniasis cases in India. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(2):346–348.
- [127] Hasker E, Malaviya P, Gidwani K, et al. Strong association between serological status and probability of progression to clinical visceral leishmaniasis in prospective cohort studies in India and Nepal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):e2657.
- [128] Soulas P, Koenig-Marrony S, Julien S, et al. A role for membrane IgD in the tolerance of pathological human rheumatoid factor B cells. *Eur J Immunol*. 2002;32(9):2623–2634.
- [129] Maity PC, Blount A, Jumaa H, et al. B cell antigen receptors of the IgM and IgD classes are clustered in different protein islands that are altered during B cell activation. *Sci Signal*. 2015; 8(394):ra93.
- [130] Geisberger R, Lamers M, Achatz G. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology*. 2006;118(4):429–437.
- [131] Ranatunga D, Hedrich CM, Wang F, et al. A human IL10 BAC transgene reveals tissue-specific control of IL-10 expression and alters disease outcome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(40):17123–17128.
- [132] Gonzaga WF, Xavier V, Vivanco BC, et al. B-1 cells contribute to susceptibility in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Parasitology*. 2015;142(12):1506–1515.
- [133] Murray HW. Interleukin 10 receptor blockade-pentavalent antimony treatment in experimental visceral leishmaniasis. *Acta Trop*. 2005;93(3):295–295.
- [134] 134. Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, et al. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7):e2914.
- [135] Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol*. 2014;36(8): 367–376.
- [136] Singh OP, Sundar S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. *Front Immunol*. 2014;5(296):1–9.
- [137] Khadem F, Uzonna JE. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. *Future Microbiol*. 2014;9(7):901–915.