

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS FUNDAMENTAIS PARA ENSAIOS *EX VIVO* DE
INVASÃO DE ERITRÓCITOS POR *PLASMODIUM VIVAX***

Luiza Barbosa Barros

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo.

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira

São Paulo

2023

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Malária: problema de saúde global	6
1.2 Malária no Brasil	6
1.3 Infecção humana	8
1.3.1 Invasão do eritrócito.....	9
1.3.2 Moléculas envolvidas no processo invasivo de <i>P. vivax</i>	10
1.3.2.1 PvDBP (<i>Duffy Binding protein</i> de <i>Plasmodium vivax</i>).....	10
1.3.2.2 PvRBPs (<i>Reticulocyte Binding Protein</i> de <i>Plasmodium vivax</i>).....	11
1.4 Ensaios de cultura ex vivo e seus desafios	12
1.4.1 Invasão de <i>Plasmodium vivax</i> restrita a reticulócitos.....	12
1.4.2 Ensaio ex vivo.....	13
1.4.3 Determinação da parasitemia por microscopia e citometria de fluxo.....	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Enriquecimento de reticulócitos	15
3.2 Descongelamento de <i>Plasmodium vivax</i>	16
3.3 Cultivo de <i>Plasmodium vivax</i>	16
3.4 Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i> para a testagem da quantificação da parasitemia por citometria de fluxo	17
3.5 Titulação dos corantes de DNA	17
4. RESULTADOS	18
4.1 Enriquecimento dos reticulócitos	18
4.1.1 Teste da densidade de Percoll.....	18
4.1.2 Teste da lavagem do sangue antes do gradiente de Percoll.....	19
4.1.3 Padronização do hematócrito (Ht) e do volume do gradiente de Percoll.....	20
4.2 Padronização do enriquecimento de esquizontes de <i>P. vivax</i>	23

4.3 Padronização da quantificação da parasitemia de <i>P. falciparum</i> por citometria de fluxo.....	23
5.DISSCUSSÃO.....	26
5.1 Enriquecimento dos reticulócitos.....	26
5.1.1 Padronização.....	26
5.2 Descongelamento e cultura de <i>Plasmodium vivax</i>.....	27
5.3 Padronização da quantificação da parasitemia por citometria de fluxo.....	27
6. CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	28
ANEXOS.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Acre
ACD	ácido cítrico citrato e dextrose
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
AMB	AUTOMACs Buffer
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DARC	<i>Duffy Antigen Receptor for chemokines</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Ht	Hematócrito
IMDM	Meio Dulbecco Modificado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PvDBP	<i>Duffy Binding Protein de Plasmodium vivax</i>
PvRBPs	<i>Reticulocyte binding Protein de Plasmodium vivax</i>
PvRBP2b	<i>Reticulocyte Binding Protein 2b de Plasmodium vivax</i>
RBP	<i>Reticulocyte binding protein</i>
spp.	Espécies
Tf	Transferrina
TfR1	Receptor 1 de transferrina
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

BARROS, L. B. **Padronização de técnicas fundamentais para ensaios *ex vivo* de invasão de eritrócitos por *Plasmodium vivax***. 2023. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

INTRODUÇÃO: O estabelecimento da cultura de *Plasmodium vivax* é elementar para o desenvolvimento de testes moleculares e vacinas. Apesar da definição da cultura de curto prazo sucedida, a reprodutibilidade ainda é um desafio a ser superado. A padronização do protocolo servirá para futuros estudos que envolvem ensaios de invasão. **OBJETIVO:** Estabelecer um protocolo de cultura *ex vivo* de *P. vivax*. Ademais, pretendemos otimizar os ensaios de invasão *ex vivo* utilizando amostras criopreservadas de *P. vivax* e reticulócitos humanos enriquecidos provenientes do sangue periférico de indivíduos saudáveis. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para obter reticulócitos do sangue de doadores saudáveis, iniciamos pela padronização de protocolos para aprimorar o enriquecimento de reticulócitos. Incluímos ou omitimos um passo de lavagem com solução de KCl de amostras de sangue leucodepletadas antes da centrifugação em gradiente de Percoll e comparamos diferentes volumes de sangue e de Percoll (3 mL ou 5 mL de cada). Além disso, testamos as concentrações de hemácias (hematócrito) para o protocolo de enriquecimento. Também comparamos dois corantes fluorescentes, *Vybrant DyeCycle Green* e *Violet*, para a quantificação da parasitemia por citometria de fluxo utilizando uma linhagem de *Plasmodium falciparum* para a padronização desta técnica. **RESULTADOS:** Mostramos que as suspensões de hemácias com 30% de hematócrito que foram submetidas a um passo de lavagem permitiram um melhor enriquecimento utilizando a centrifugação em gradiente de Percoll, começando com pequenos volumes de amostra (3 mL). É importante salientar que os reticulócitos sobrevivem a períodos relativamente longos (até 8 dias) de armazenamento a 4 °C. Em seguida, mostramos que o corante *Vybrant DyeCycle Green* nas diluições 1:2500, 1:5000 ou 1:10000 permitiu uma melhor quantificação dos parasitas do que o *Vybrant DyeCycle Violet*. **CONCLUSÃO:** A técnica de enriquecimento de reticulócitos foi padronizada. Determinamos o hematócrito ideal a ser utilizado e a necessidade de etapas de lavagens para um melhor enriquecimento de reticulócitos. Além disso, conseguimos quantificar a parasitemia por citometria de fluxo utilizando pequenos volumes da cultura marcada com o corante *Vybrant DyeCycle Green*. Os ensaios de invasão não puderam ser realizados porque obtivemos quantidades muito baixas de estágios assexuados viáveis de *P. vivax* no sangue após o descongelamento de hemácias infectadas criopreservadas, mas o estágio está definido para experimentos futuros.

Palavras-chave: Malária, Cultivo, *Plasmodium vivax*, Padronização.

ABSTRACT

BARROS, L. B. **Standardization of basic techniques for ex vivo erythrocyte invasion assays by *Plasmodium vivax***. 2023. 32. f. Pharmacy-Biochemistry Course Completion Work – Faculty of Pharmaceutical Sciences – University of São Paulo, São Paulo, 2023.

INTRODUCTION: The establishment of a *Plasmodium vivax* culture is essential for the development of molecular tests and vaccines. Despite the successful definition of the short-term culture, reproducibility is still a challenge to be overcome. Standardizing the protocol will serve future studies involving invasion assays. **AIMS:** We aimed to establish an ex vivo *P. vivax* culture protocol. In addition, we aimed to optimize ex vivo invasion assays using cryopreserved *P. vivax* samples and enriched human reticulocytes from the peripheral blood of healthy individuals. **METHODS:** To obtain reticulocytes from the peripheral blood of healthy donors, we first standardized protocols for improved reticulocyte enrichment. We either included or omitted a washing step with KCl solution of leukocyte-depleted blood samples before Percoll gradient centrifugation and compared different volumes of blood and Percoll solution (3 mL or 5 mL of each). In addition, we tested red cell concentrations (hematocrits) for the enrichment protocol. We also compared two fluorescent dyes, Vybrant DyeCycle Green and Violet, for parasite quantification by flow cytometry using a strain of *Plasmodium falciparum* to standardize this technique. **RESULTS:** We showed that red blood cell suspensions with 30% hematocrit that underwent a washing step allowed for a better reticulocyte enrichment using Percoll centrifugation, starting with small (3-mL) sample volumes. Importantly, reticulocytes survived relatively long (up to 8 days) periods of storage at 4°C. Next, we showed that the Vybrant DyeCycle Green dye at either 1:2,500, 1:5,000, or 1:10,000 dilution allowed for better parasite quantification than the Vybrant DyeCycle Violet dye. **CONCLUSIONS:** The reticulocyte enrichment technique was standardized. We determined the optimal hematocrit to be used and the need for washing steps for a better reticulocyte enrichment. Furthermore, we were able to quantify parasitemia by flow cytometry using small volumes of culture labeled with Vybrant DyeCycle Green dye. Invasion assays could not be carried out because we obtained very low quantities of viable *P. vivax* asexual blood stages after thawing cryopreserved infected red blood cells, but the stage is set for future experiments.

Keywords: Malaria, Culture, *Plasmodium vivax*, Standardization.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária: problema de saúde global

A malária é uma das doenças com maior relevância no cenário mundial. De acordo com o último relatório, no ano de 2021, estima-se que 247 milhões de incidência e 619 mil mortes foram causadas pelo parasita do gênero *Plasmodium* em 85 países (WHO, 2022).

Há cinco espécies parasitárias causadoras da malária humana: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*, sendo as duas primeiras as que apresentam maior ameaça por serem as mais prevalentes (WHO, 2022).

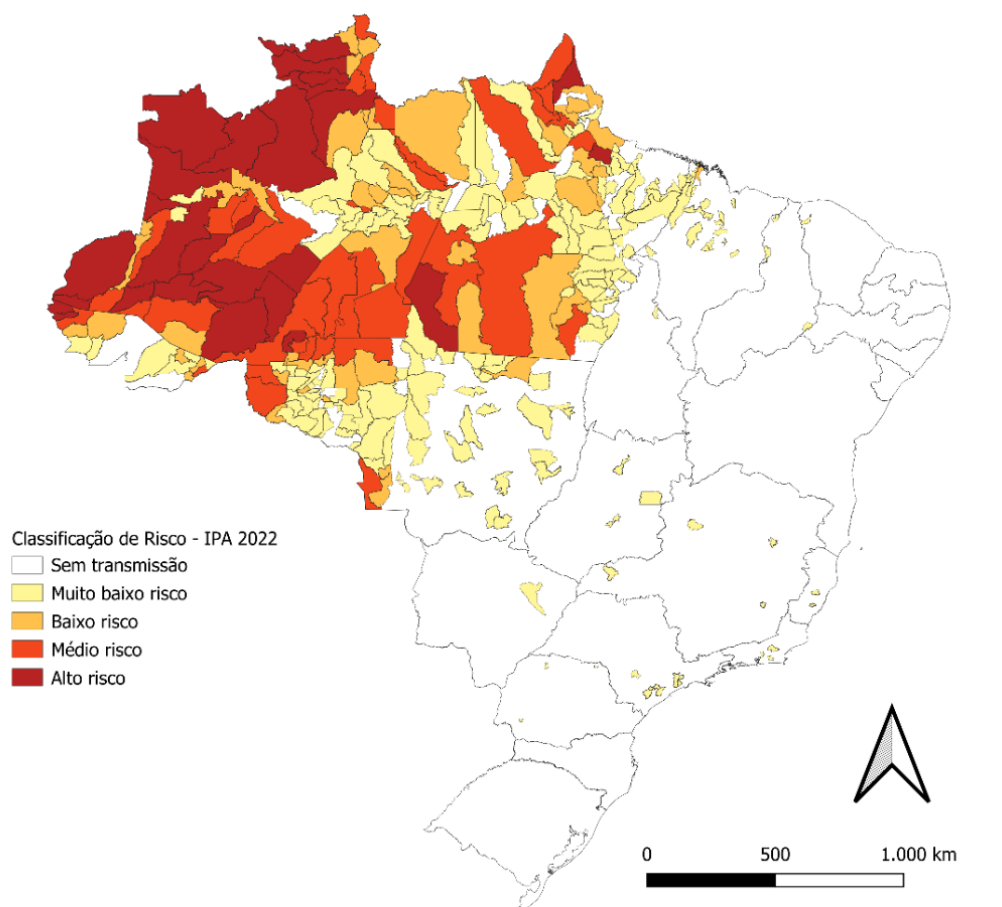
A maioria dos casos ocorrem no continente Africano e majoritariamente causados por *P. falciparum*, que também é dominante no Sudeste Asiático, Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental. Nas Américas, o *Plasmodium vivax* é prevalente e responsável por 75% dos casos de malária (WHO, 2023).

Conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2021 cerca de 50% da população mundial corria o risco de contrair malária. Grupos como: crianças abaixo de cinco anos, lactantes, mulheres grávidas, pacientes HIV/AIDS e demais pessoas que transitam por áreas endêmicas são consideradas populações de alto risco para adquirir malária (WHO, 2022).

1.2 Malária no Brasil

A malária representa um grave problema de saúde pública encontrada principalmente em países tropicais (WHO, 2023). No Brasil, no ano de 2022, foram registrados 128.977 casos de malária autóctone, dos quais cerca de 99% dos registros são provenientes da região amazônica (Figura 1). A maioria dos casos, que corresponde a 84,2%, são ocasionados por *P. vivax*, sendo a cidade de Alto Alegre, no estado de Roraima, a que teve o maior número de casos notificados, totalizando 15.443 novos casos no ano de 2022, e apresentou IPA de 654,86 por 1000 habitantes (BRASIL, 2023; BRASIL, Ministério da Saúde).

Figura 1 – Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2022.



Classificação da Incidência Parasitária Anual (IPA): Sem transmissão - 0 casos autóctones; Muito baixo risco - IPA <1 caso/1.000 habitantes; Baixo risco - IPA <10 casos/1.000 habitantes; Médio risco - IPA <50 casos/1.000 habitantes; Alto risco - IPA $\geq$ 50 casos/1.000 habitantes.

Data de atualização dos dados: 11 de julho de 2023. Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVSA/MS e E-SUS-VS.

Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 2023.

De acordo com o Ministério da Saúde (2023), no ano de 2017 registraram-se 189.515 casos de malária autóctone no país. E a partir desse ano, ocorreu uma queda contínua de novos casos registrados. Esse declínio possivelmente ocorreu devido ao uso de medicamentos eficazes recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BRASIL, 2022).

Além disso, a maior parte desses casos centralizou-se em regiões rurais e indígenas correspondendo a 37,34% e 31,04%, respectivamente. Espaços de garimpo que registraram aumento de números de casos, enquadradas como hiperendêmicas, que apresentam significativa importância para a questão de controle da doença na região (Tabela 1).

Tabela 1 - Casos autóctones de malária evidenciados por áreas de infecções, Brasil, 2021 e 2022.

Áreas de infecção	2021		2022		Variação % entre 2021 e 2022
	Número de casos	% do total	Número de casos	% do total	
Rural	50.883	37,09%	47.584	37,34%	-6,48%
Indígena	46.095	33,60%	39.549	31,04%	-14,20%
Garimpo	20.530	14,96%	22.859	17,94%	11,34%
Urbana	11.969	8,72%	10.467	8,21%	-12,55%
Assentamento	7.724	5,63%	6.962	5,46%	-9,86%
Total	137.201	100,00%	127.421	100,00%	-7,13%

Fonte: Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde, 2023. Dados atualizados em: 20/09/2023

Outro ponto de grande importância epidemiológica é o desmatamento da floresta Amazônica, que resulta em aumento do número de casos de malária na região (AMINO *et al.*, 2006).

O principal vetor responsável pelos altos registros de malária humana no país é o *Anopheles darlingi* (PIMENTA *et al.*, 2015). No Brasil, a borrifação intradomiciliar e uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas são estratégias de controle químico utilizadas em áreas endêmicas com o objetivo de diminuir o contato humano-vetor e, desse modo, reduzir novos casos de malária. Entretanto, pouco se sabe do impacto desses mosquiteiros sobre a população assistida (FIGUEIRA, 2022).

1.3 Infecção humana

A infecção humana inicia-se pelo repasto sanguíneo realizado pela fêmea do vetor *Anopheles*, que ao depositar sua saliva acaba introduzindo na derme cerca de 15 a 200 esporozoítos (AMINO *et al.*, 2006). Os esporozoítos alcançam a corrente sanguínea e chegam ao fígado, local onde os hepatócitos tornam-se abrigo para a esquizogonia hepática, multiplicação assexuada (COX, 2010), que posteriormente

resulta na produção de 16 a 32 merozoítos, que caem na corrente sanguínea para invadir as hemácias (COWMAN *et al.*, 2017).

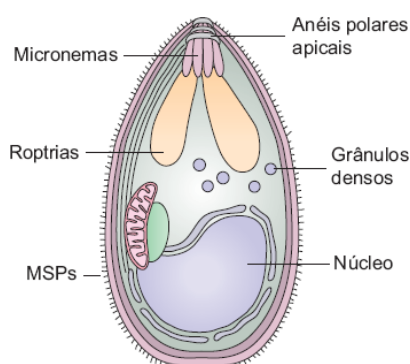
Tanto os esporozoítos quanto os merozoítos de *Plasmodium* spp. estão adaptados para invadirem, respectivamente, hepatócitos e hemácias, tipos celulares aos quais o parasita possui tropismo (COWMAN *et al.*, 2017).

Os merozoítos abrigam-se nas hemácias para a esquizogonia sanguínea e possuem uma única meta - invadir a hemácia mais próxima, replicar-se por fissão binária e liberar mais merozoítos que resultam na ruptura das hemácias e propiciam os picos febris que são característicos da malária (BRASIL. Ministério da Saúde).

1.3.1 Invasão do eritrócito

Os merozoítos, uma das formas encontradas durante o estágio sanguíneo da infecção, invadem exclusivamente hemácias (KANJEE *et al.*, 2018). O *Plasmodium* spp. possui duas principais espécies que infectam humanos: *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, com o primeiro tendo a capacidade de invadir eritrócitos de todas as idades, e o segundo sendo mais restrito às hemácias mais jovens (MALLERET *et al.*, 2017). Essas células, chamadas de reticulócitos, são eritrócitos imaturos enucleados que contêm material reticular. Os merozoítos possuem estruturas necessárias para o processo de invasão, como: roptrias e micronemas (Figura 2) que secretam proteases durante o processo de invaginação e são facilitadores do processo invasivo (DE NIZ *et al.*, 2017).

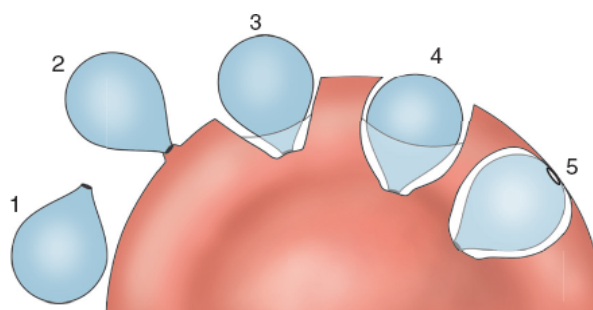
Figura 2 - Representação estrutural de um merozoíto de plasmódio



Fonte: FERREIRA *et al.* (2021)

O processo de invasão ocorre, basicamente, em cinco etapas (Figura 3). Inicialmente, ocorre o reconhecimento dos receptores superficiais das hemácias, que é seguido pela reorientação apical do merozoíto para a membrana da hemácia. O terceiro passo é a invaginação do merozoíto e, posteriormente, as interações de alta afinidade entre o merozoíto e os receptores dos eritrócitos. Durante o último passo, ocorre o fechamento do vacúolo formado, com o merozoíto no interior da célula (COWMAN *et al.*, 2017).

Figura 3 - Representação esquemática do processo de interação do merozoíto com o eritrócito



Fonte: FERREIRA *et al.* (2021)

Desde a década de 1970 os estudos de cultura de *P. falciparum* foram muito dominantes e desenvolvidos comparado com *P. vivax*, pois sua invasão não é restrita à presença de reticulócitos (CHAN *et al.*, 2020). Desse modo, ainda existem muitos obstáculos para a padronização dessa ferramenta para alavancar a pesquisa de *P. vivax* ao nível de *Plasmodium falciparum*.

Diversos avanços foram conquistados no cultivo de *Plasmodium knowlesi* e *Plasmodium cynomolgi*. Entretanto, para o *P. vivax* falta um método exato para seu cultivo uma vez que um dos principais impedimentos é a nossa inaptidão de lidar com os parasitas de forma eficiente (THOMSON-LUQUE & BAUTISTA, 2021).

1.3.2 Moléculas envolvidas no processo invasivo de *P. vivax*

1.3.2.1 PvDBP (*Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax*)

O *Plasmodium vivax* é a espécie com maior dispersão geográfica. Esse parasita possui preferência por infectar reticulócitos, glóbulos vermelhos jovens

(MUELLER *et al.*, 2009). A interação antígeno-receptor de *Duffy Binding Protein* de *Plasmodium vivax* (PvDBP) e *Duffy Antigen Receptor for Chemokine* (DARC) expresso na superfície de hemácias (MILLER *et al.*, 1976) foi amplamente estudada com a finalidade de saber se esta seria a principal interação para a entrada do parasita nos reticulócitos, pois eritrócitos humanos negativos para DARC apresentaram resistência à invasão *in vitro* por *P. knowlesi* (MILLER *et al.*, 1976).

Todavia, observou-se presença de *P. vivax* em indivíduos com DARC negativo, indicando que *P. vivax* pode invadir eritrócitos por outras interações antígeno-receptor (WOLDEAREGAI *et al.*, 2013).

1.3.2.2 PvRBPs (*Reticulocyte binding protein* de *Plasmodium vivax*)

No sequenciamento genômico de *P. vivax* foram identificados 11 membros da família *Reticulocyte binding protein* (RBP): PvRBP1a, PvRBP1b, PvRBP2a, PvRBP2b, PvRBP2c, PvRBP1p1, PvRBP2p1, PvRBP2p2, PvRBP2d, PvRBP2e, PvRBP3 (CARLTON *et al.*, 2008; HESTER *et al.*, 2013).

O *Plasmodium vivax* invade preferencialmente reticulócitos que expressam Receptor 1 de transferrina (TfR1) (MALLERET *et al.*, 2015), que é uma proteína importante para a manutenção do transporte de ferro para as células que forma um complexo com transferrina (Tf) (CHENG *et al.*, 2004). Das hemácias circulantes, TfR1 é expresso exclusivamente nos eritrócitos jovens e é perdido ao longo da maturação (PAN & JOHNSTONE, 1983). Além disso, TfR1 é importante para a invasão do parasita, pois células que expressam formas mutantes são refratárias à invasão de *P. vivax* (GRUSZCZYK *et al.*, 2018).

A proteína PvRBP2b, de 326 kDa (CHAN *et al.*, 2021), é a que se liga no TfR1. Contudo, já foi mostrado que anticorpos monoclonais de camundongos específicos para esta proteína são capazes de inibir a ligação PvRBP2b-TfR1 e bloqueiam a invasão de *Plasmodium vivax* em aproximadamente 50% em isolados brasileiros e tailandeses (GRUSZCZYK *et al.*, 2018).

Em 2021, estudos caracterizaram funcionalmente anticorpos monoclonais anti-PvRBP2b, obtidos a partir de células B de dois indivíduos do Camboja que sofreram de infecções naturais por *P. vivax* (CHAN *et al.*, 2020). Até o momento, esses anticorpos monoclonais humanos não foram avaliados quanto a sua

capacidade em inibir a invasão de reticulócitos pelo *P. vivax* em ensaios de cultura *ex vivo*.

1.4 Ensaios de cultura *ex vivo* e seus desafios

Durante um longo período da história, *Plasmodium vivax* foi associado ao causador da “malária benigna” e isso contribuiu para o atraso dos estudos, comparado com *Plasmodium falciparum* (MUELLER *et al.*, 2009). Estudos em cultura *in vitro* de *P. vivax* foram desenvolvidos e apresentaram dificuldades pela ausência de um sistema contínuo, uma vez que *P. vivax* invade preferencialmente reticulócitos (CHAN *et al.*, 2021) e, por esse motivo, há alta exigência de alimentação desses eritrócitos jovens. Além disso, o procedimento é trabalhoso e necessita de um cronograma rígido de atenção a cada 12 horas em dias alternados (GOLEND *et al.*, 1997).

1.4.1 Invasão de *Plasmodium vivax* restrita a reticulócitos

Os merozoítos de *Plasmodium vivax* invadem apenas os reticulócitos (MALLERET *et al.*, 2015), na qual a maturação dessas células é definida pelo grau de expressão de CD71 (CD71^{alto}, CD71^{médio}, CD71^{baixo} e CD71^{negativo}), uma vez que CD71^{alto} está presente em reticulócitos imaturos e CD71^{negativo} em maduros (MALLERET *et al.*, 2015).

A porcentagem de reticulócitos encontrada no sangue periférico humano está entre 0,5%-1,6% (FEENEY *et al.*, 2005). Desse modo, o enriquecimento de reticulócitos para uso em cultura de *P. vivax* é um desafio a ser superado, pois os reticulócitos amadurecem rapidamente em condições de cultura (NEAFSEY *et al.*, 2013) e exige uma reposição contínua.

Com a finalidade de melhorar o rendimento do enriquecimento de reticulócitos, algumas tentativas foram realizadas: purificação de reticulócitos de pacientes com hemocromatose, reticulócitos obtidos de cordão umbilical, desenvolvimento de linhagens progenitoras de células hematopoiéticas (GUNALAN *et al.*, 2020) e o enriquecimento de reticulócitos do sangue periférico.

Pacientes com hemocromatose apresentam maior porcentagem de reticulócitos circulantes, que costumam estar elevados de 3 a 10 vezes, aliado ao

tratamento, comparada a adultos normais (GOLEND *et al.*, 1997). De acordo com estudo realizado com *Plasmodium vivax* Sal-1 para avaliar diferentes condições de cultura de curto prazo, foi observado que utilizando amostras sanguíneas de pacientes que sofrem de hemocromatose houve rendimento de no máximo 3 vezes, fator que pode ser explicado pela diferença de tratamento comparado com 1997, uma vez que antes eram realizadas remoções repetidas de unidades de sangue antes da flebotomia (SHAW-SALIBA *et al.*, 2016).

A utilização de sangue de cordão umbilical humano como fonte de reticulócitos é outra alternativa para o enriquecimento de reticulócitos, em virtude de que há alta porcentagem de eritrócitos jovens comparada ao sangue periférico (RUSSELL *et al.*, 2011). Em estudo com amostra de cordão umbilical, com porcentagem inicial de 4,6% de reticulócitos, foi alcançado uma média de 57,8% após o enriquecimento (RUSSELL *et al.*, 2011). Isso representou uma vantagem para a cultura de *P. vivax*, uma vez que foi reprodutível adquirir uma maior quantidade de reticulócitos (DARWIN *et al.*, 2013).

As células hematopoiéticas possuem a capacidade de se diferenciar em células especializadas do tecido sanguíneo. Desse modo, pode ser uma potencial fonte de reticulócitos (PANICHAKUL *et al.*, 2007). De acordo com o estudo, os resultados revelaram que uma grande quantidade de reticulócitos foram obtidos no 14º dia, entretanto, o método aplicado é muito complexo e caro, fatores que limitam a aplicabilidade em muitos grupos que trabalham com malária (DARWIN *et al.*, 2013).

A concentração de reticulócitos no sangue periférico humano saudável não é o suficiente para sustentar uma cultura de *P. vivax in vitro* (GOLEND *et al.*, 1997). Diante disso, a técnica de enriquecimento de reticulócitos obtidos de sangue periférico utilizando gradiente de Percoll passou a ser um procedimento relativamente fácil e acessível, sendo uma fonte promissora de reticulócitos a ser utilizada nos ensaios de cultura.

1.4.2 Ensaio *ex vivo*

Atualmente, o procedimento viável, contudo, o mais prático e reprodutível de cultivar *P. vivax* é usar isolados *ex vivo* (RUSSELL *et al.*, 2012), pois ainda que esteja trabalhando fora do organismo, as condições são mais realistas e há o

mínimo de perturbação do sistema. Entretanto, há desafios a serem superados como: baixa parasitemia apresentado por *P. vivax* (MOREIRA *et al.*, 2015), população assíncrona e morte significativa de parasitas durante a maturação intraeritrocitária (RANGEL *et al.*, 2018).

Portanto, o ensaio *ex vivo* de *Plasmodium vivax* é uma alternativa promissora para o cultivo dos parasitas, sendo de grande importância o estudo das diferentes maneiras de adaptação e padronização do protocolo de cultivo, assim como do enriquecimento de reticulócitos que são necessários para a manutenção do parasito *ex vivo*.

1.4.3 Determinação da parasitemia por microscopia e citometria de fluxo

Após o cultivo do parasita, a quantificação da parasitemia no ensaio de invasão pode ser determinada pelo método baseado em citometria de fluxo, bem como pela microscopia óptica.

De acordo com o estudo, que avaliou a medição precisa da parasitemia por citometria de fluxo diferenciando eritrócitos infectados por único parasita ou mais, foi mostrado que essa técnica é altamente comparável à microscopia óptica. A taxa com que a citometria de fluxo detecta eritrócitos infectados comparada à microscopia óptica é rápida, principalmente para culturas que possuem baixa parasitemia (BEI *et al.*, 2010). Além disso, a facilidade e a especificidade a torna mais precisa para medição de efeitos inibitórios de anticorpos nos ensaios de invasão, pois possibilita analisar reticulócitos infectados utilizando marcadores para CD71 (molécula expressa nestas células) e corantes específicos de ácido desoxirribonucleico (DNA), que marcam o DNA do parasita, uma vez que reticulócitos são desprovidos (BEI *et al.*, 2010).

Apesar de ser o “padrão ouro” para medição precisa, a citometria de fluxo é uma técnica dispendiosa e necessita de equipamentos sofisticados além de pessoas treinadas para utilizá-la (IMADE *et al.*, 2005). Por outro lado, a técnica da microscopia óptica que é padrão ouro para detecção da parasitemia de malária (WHO), comparada a citometria de fluxo é mais acessível e de fácil manuseio quando devidamente treinada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Otimizar o protocolo de enriquecimento de reticulócitos provenientes de amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis e padronizar a quantificação da parasitemia por citometria de fluxo.

2.2 Objetivos específicos

1. Otimizar o enriquecimento de reticulócitos utilizando amostras frescas de sangue periférico de indivíduos saudáveis, testando diferentes condições da técnica.
2. Padronizar a cultura *ex vivo* de *Plasmodium vivax*.
3. Avaliar a quantificação da parasitemia pelo método de citometria de fluxo utilizando *Plasmodium falciparum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Enriquecimento de reticulócitos

Para todos os experimentos foram coletados cerca de 70 mL de sangue venoso de doadores saudáveis, em tubos com ácido cítrico citrato e dextrose (ACD) (BD Bioscience). O volume de sangue foi passado primeiramente por um filtro de leucodepleção (BioR 01 Plus, Fresenius Kabi). Posteriormente, o sangue leucodepletado foi centrifugado a 1000 g, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Uma parte da amostra foi utilizada para o teste de quatro concentrações de Percoll (64%, 65%, 67% e 69%), diluído em solução de KCl (RANGEL *et al.*, 2018), com a finalidade de encontrar a concentração ideal para o enriquecimento dos reticulócitos de cada amostra sanguínea coletada.

Foram realizados alguns testes para verificar a melhor eficiência no enriquecimento dos reticulócitos. Foi comparada a lavagem ou não, com KCl *buffer*, do sangue leucodepletado antes da centrifugação em gradiente de Percoll, assim como diferentes quantidades de amostra/sangue e Percoll (3 mL ou 5 mL de cada fração) para verificar se há uma melhora na obtenção e purificação de reticulócitos.

Ademais, foram testadas diferentes porcentagens de hematócrito, que consiste na porcentagem de glóbulos vermelhos em relação ao volume total de sangue, para verificarmos se este é um fator que influencia na concentração final de reticulócitos enriquecidos. A quantificação de reticulócitos foi realizada por microscopia óptica, utilizando o retículo de Miller, a partir de esfregaços corados com Novo Azul de Metileno.

3.2 Descongelamento de *Plasmodium vivax*

As amostras de sangue parasitado por *Plasmodium vivax* foram coletadas de indivíduos infectados por *P. vivax* residentes na cidade de Mâncio Lima, pertencente ao estado do Acre (AC). O projeto de pesquisa CAAE nº 63942222.9.000.5467, sob responsabilidade da pesquisadora Natália Soares Fernandes, contribuiu para a padronização de técnicas do projeto de TCC. Essas amostras sanguíneas foram leucodepletadas, ainda em campo, utilizando filtro BioR 01 Plus (Fresenius Kabi), seguida da adição de *Glycerolyte* (Glicerina; $\text{NaC}_3\text{H}_5\text{O}_3$; KCl; pH 7,2) e criopreservadas em nitrogênio líquido até serem utilizadas nos experimentos (NICOLETE, 2017).

No laboratório, em São Paulo, os criotubos contendo as amostras foram descongelados em banho maria a 37 °C. Após descongelamento, o sangue parasitado foi transferido para tubos tipo Falcon de 50 mL e foram adicionadas soluções de NaCl a 12% e 1,6%, seguida de lavagens com meio de cultura, meio dulbecco modificado (IMDM) (*GE Healthcare*). Checou-se a viabilidade parasitária em lâminas de esfregaço coradas com panótico rápido LB (Laborclin, Paraná, Brasil) (NICOLETE, 2017).

3.3 Cultivo de *Plasmodium vivax*

Após a checagem da viabilidade, os parasitas foram colocados em garrafas de cultura, a um hematócrito entre 3 a 12%, com meio IMDM completo: sem L-Glutamina (*GE Healthcare*), suplementado com 10% de soro AB+ inativado, 1% de Glutamax (Gibco), com adição de uma mistura de gases contendo 5% O_2 , 5% CO_2 e 90% N_2 e mantidos em estufa a 37 °C.

Após 36 horas de incubação, a partir de uma alíquota da cultura foram realizados esfregaços para observação da viabilidade e dos estágios dos parasitos por microscopia. Quando observado que cerca de 50% dos parasitos estavam em estágio de esquizonte jovem, a cultura foi coletada para o enriquecimento dos esquizontes utilizando gradiente de Percoll a 45%, que foi centrifugado a 1200 x g por 15 min.

As lâminas foram analisadas na objetiva 63x no microscópio óptico Zeiss Axio Imager M2 (Jena, Germany) com óleo de imersão. As imagens foram capturadas com a câmera Zeiss AxioCam HRc (Jena, Germany), no qual foi observado um campo claro com hemácias e esquizontes de *Plasmodium vivax*, proveniente de um esfregaço sanguíneo corado com panótico rápido LB (Laborclin, Paraná, Brasil).

3.4 Cultura de *Plasmodium falciparum* para a testagem da quantificação da parasitemia por citometria de fluxo

Neste experimento, os parasitas de *P. falciparum* (cedidos pelo laboratório do Dr. Alejandro Katzin) foram importantes para simular o comportamento dos futuros experimentos com *P. vivax* para a quantificação da parasitemia por citometria de fluxo.

A cultura foi realizada em uma placa de 96 poços, com fundo chato, contendo em cada poço 2 uL de hemácias com parasitemia de 1%, em um volume final de 100 uL de meio RPMI. A placa foi colocada em um recipiente hermeticamente fechado, contendo gaze umedecida com água, e adicionado uma mistura gasosa de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂ (30 segundos com a válvula aberta e 30 segundos com válvula fechada). A incubação ocorreu em estufa seca a 37 °C por 20 horas.

Após as 20 horas de incubação, as amostras foram transferidas para uma placa fundo V, foi adicionado AUTOMACs Buffer (AMB) [5 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 1% (w/v) *Bovine Serum Albumin, Fraction V*; *Phosphate buffered saline* (PBS) pH 7.4] para lavagem e a placa foi centrifugada a 800 x g por 5 minutos. Em seguida foi retirado o sobrenadante e adicionado novamente 100 uL AMB para uma segunda lavagem. Após o descarte do sobrenadante, em cada poço foi adicionada uma concentração diferente dos corantes específicos de DNA.

3.5 Titulação dos corantes de DNA

O teste da marcação de células parasitadas pelo *P. falciparum* foi realizado utilizando o corante *Vybrant DyeCycle Green (Invitrogen V35004)* e *Vybrant Violet (Invitrogen V35003)*. Para cada um, foram testadas as diluições: 1:2.500, 1:5.000 e 1:10.000. As diluições foram realizadas na solução AMB. Assim, foram adicionados 100 uL de cada diluição dos corantes por poço, que foram incubados em estufa seca a 37 °C por 20 minutos, sem lavagens posteriores. Em seguida, as amostras foram transferidas para minitubos de citometria e mantidas no gelo até a leitura no citômetro.

Os dados da citometria de fluxo foram analisados no *software* FlowJo 9.9.6 (TreeStar), sendo utilizados gráficos de pontos (*pseudocolor plots*) para analisar os resultados.

As células provenientes da cultura foram adquiridas no citômetro de Fluxo LSRFortessa (BD Bioscience), sendo adquiridos 200.000 eventos totais por amostra. Anteriormente, foi retirada uma alíquota da placa de cultura incubada por 20 horas para verificação da parasitemia por microscopia, utilizando o protocolo de contagem por Retículo de Miller (LIM *et al.*, 2016). Para isso, foi realizado um esfregaço corado com panótico rápido, como descrito anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1 Enriquecimento dos reticulócitos

A exclusividade para infecções de reticulócitos por *P. vivax* é um fator limitante para o ensaio de invasão. Dessa forma, para um bom resultado de enriquecimento destas células, foram testadas amostras de sangue lavado ou não; diferentes quantidades de sangue e Percoll para o gradiente (3 e 5 mL), e diferentes porcentagens de hematócrito para a padronização do protocolo.

4.1.1 Teste da densidade de Percoll

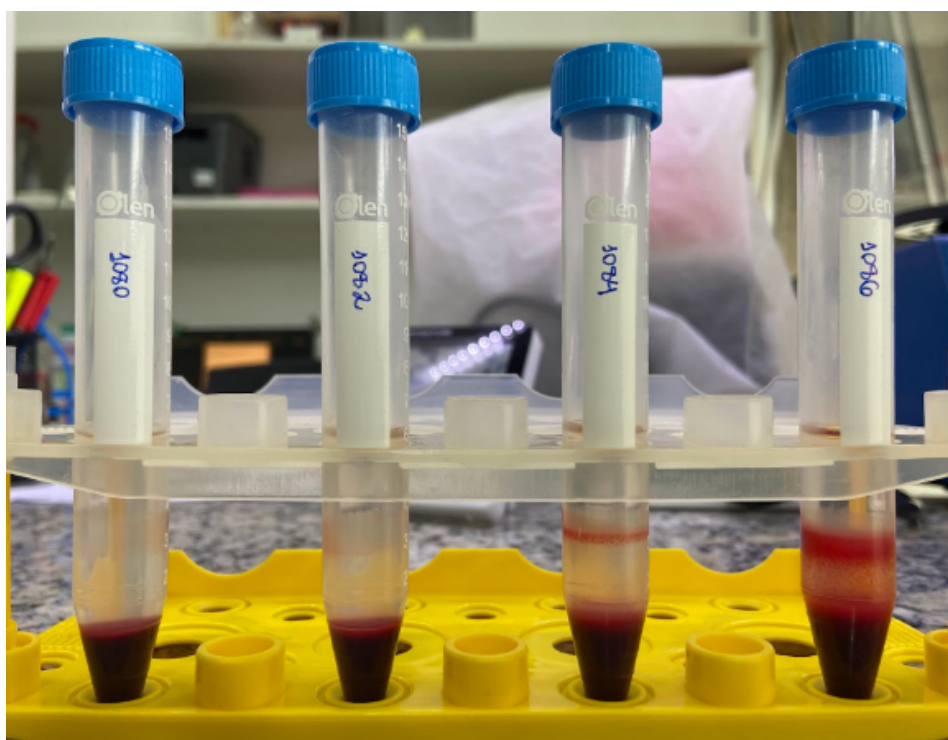
O teste preliminar para determinação da densidade de Percoll é importante, pois cada indivíduo possui uma concentração ideal, que pode variar entre 1080, 1082, 1084 e 1086 g/mL. Seguindo o protocolo, o gradiente ideal para o

enriquecimento de reticulócitos de cada amostra coletada possibilita maior sucesso no experimento (RANGEL *et al.*, 2018).

Para a aplicação da técnica de centrifugação em gradiente de Percoll, cada amostra coletada foi testada utilizando quatro densidades diferentes, que representam as seguintes porcentagens de Percoll na solução: 64%, 65%, 67% e 69%.

A figura 4 mostra o gradiente formado após a centrifugação, ficando evidente que para esta amostra a densidade mais adequada e que deve ser escolhida para o enriquecimento de reticulócitos é a 1084 g/mL (67% de Percoll), pois é a que mostrou a formação de um anel de reticulócitos mais nítido.

Figura 4 - Quatro gradientes de Percoll para a melhor visualização do anel de reticulócitos

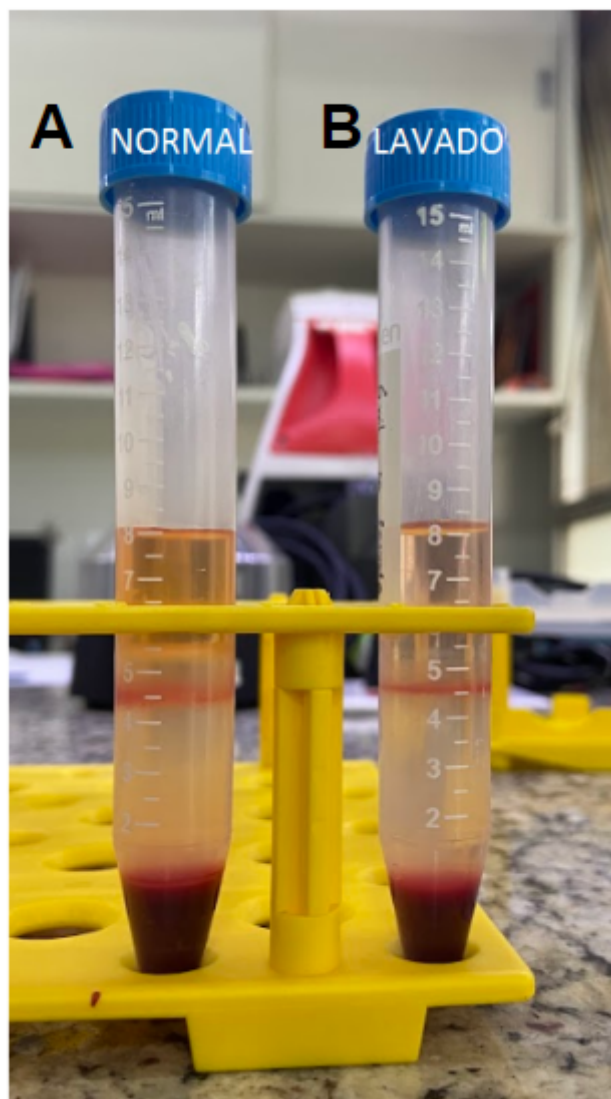


Fonte: Autoria própria

4.1.2 Teste da lavagem do sangue antes do gradiente de Percoll

Os tubos contendo sangue lavado, em solução KCl duas vezes após a leucodepleção, e tubos controle (não lavado), foram testados e comparados após a centrifugação do gradiente de Percoll. Nesse experimento, foi observado que os tubos com sangue lavado (figura 5B) ficaram com anéis de reticulócitos mais evidentes quando comparados aos tubos onde foram utilizados sangue não lavado.

Figura 5 : Tubo controle (A) e lavado (B) de anel de reticulócitos em gradiente de Percoll



Fonte: Autoria própria

A partir deste resultado, decidimos padronizar o experimento de enriquecimento de reticulócitos utilizando amostra de sangue lavado para a realização do gradiente de Percoll por facilitar a visibilidade do anel de reticulócitos.

4.1.3 Padronização do hematócrito (Ht) e do volume do gradiente de Percoll

Diferentes hematócritos foram testados para verificarmos a porcentagem ideal a ser utilizada a fim de obter um enriquecimento que gere maior número de reticulócitos recuperáveis. Foram testadas amostras contendo hematócritos de 20%,

30% e 50% (diluídas em solução KCl), para posterior realização do gradiente de Percoll.

Nos experimentos, utilizamos como variáveis o volume do gradiente, na proporção 1:1 de sangue e Percoll, sendo testados 3 e 5 mL de cada, assim como diferentes hematócritos (20%, 30% e 50%), utilizando tubos tipo Falcon de 15 mL, e amostras de dois doadores saudáveis. Os resultados da porcentagem de reticulócitos obtidos em cada experimento teste estão expostos na tabela 2.

Tabela 2: Média da porcentagem de reticulócitos obtidos em diferentes condições

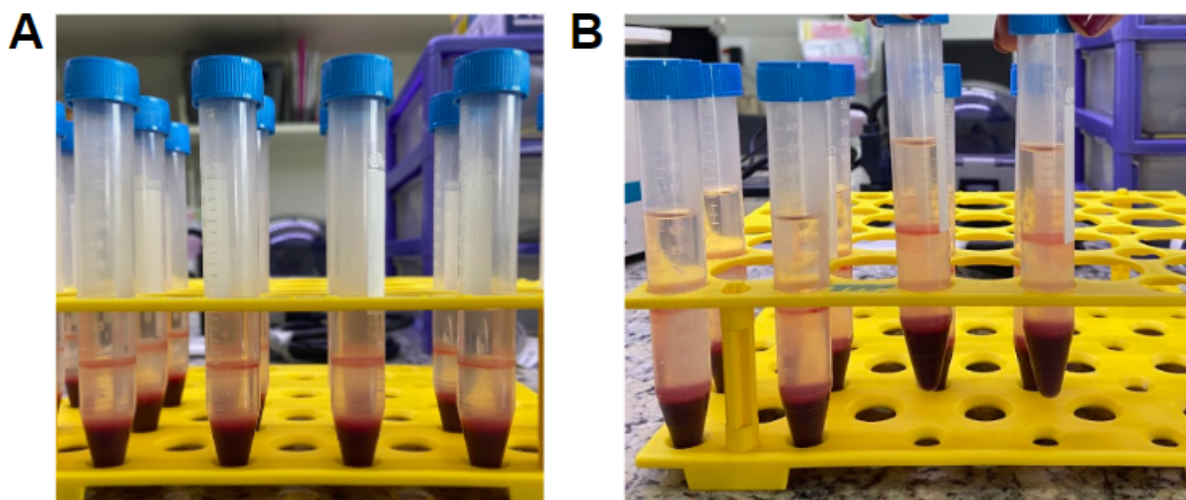
Ht	Doador A			Doador B		
	Antes do enriquecimento	3 mL	5 mL	Antes do enriquecimento	3 mL	5 mL
20%	0,6%	12,9%	15,6%	—	—	—
30%	0,7%	24,6%	18%	0,8%	13,75%	7,73%
50%	—	—	—	0,5%	14,20%	12,50%

Nota: Os traços indicam ausência de resultados. O volume de 3 mL representa a proporção 1:1 de sangue/Percoll em volume final de 6 mL. O volume de 5 mL representa a proporção 1:1 de sangue/Percoll em volume final de 10 mL. Ht = hematócrito.

Fonte: Autoria própria

Utilizando um Ht de 30%, ambos os tubos contendo um volume de 3 mL (figura 6A) ou 5 mL (figura 6B) apresentaram anéis de reticulócitos evidentes, entretanto, o tubo com volume de amostra de 3 mL sempre ficou melhor definido. Dessa forma, decidimos padronizar o enriquecimento de reticulócitos utilizando amostras de sangue lavadas, hematócrito de 30 %, e volume de 3 mL de sangue e 3 mL de Percoll para a realização do gradiente.

Figura 6 - Tubos de 3 mL (A) e 5 mL (B) com anel de reticulócitos em gradiente de Percoll



Fonte: Autoria própria

Além dos testes de diferentes condições para melhor enriquecimento de reticulócitos, checamos o nível de maturação dos reticulócitos quando armazenados em geladeira a 4 °C. Como mostrado na tabela 3, a porcentagem de reticulócitos foi calculada após 1, 2, 3, 6 e 8 dias de armazenamento.

Tabela 3: Contagem de reticulócitos após armazenamento em geladeira

Dia	Nº eritrócitos	Nº reticulócitos	% reticulócitos
01	116	108	10,34
02	115	109	10,53
03	113	99	9,02
06	115	105	10,14
08	113	94	9,24

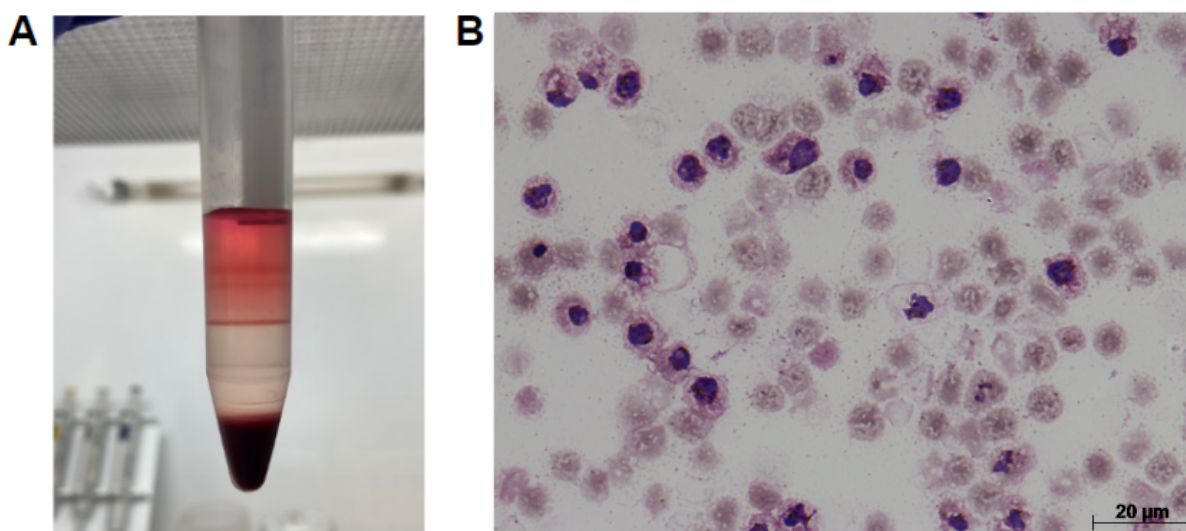
Fonte: Autoria própria

Os resultados mostram que houve uma baixa variação do nível de reticulócitos ao longo de oito dias corridos de armazenamento em geladeira (média: 9,85%; desvio-padrão: 0,67%).

4.2 Padronização do enriquecimento de esquizontes de *P. vivax*

Após o descongelamento, as amostras de *P. vivax* foram mantidas em cultura em torno de 39 horas, e a partir de uma amostra foram realizados esfregaços corados com panótico rápido LB (Laborclin, Paraná, Brasil) onde observamos a presença de esquizontes com quatro núcleos ou mais. Em seguida, realizamos o enriquecimento de esquizontes por gradiente de Percoll a 45%, que após a centrifugação foi possível visualizar o anel contendo os parasitas (figura 7A). Por microscopia, confirmamos a presença de esquizontes, contudo, observamos também a presença de muitas células não infectadas (figura 7B). A quantidade volumétrica de esquizontes enriquecidos neste experimento foi de apenas 2 uL, um volume que inviabilizou a continuação do experimento para os ensaios de invasão *ex vivo*.

Figura 7 - Anel de esquizonte em gradiente de Percoll 45% (A) e lâmina de esfregaço com esquizontes enriquecidos (imagem capturada utilizando objetiva de 63x com óleo de imersão) (B)



Fonte: Autoria própria

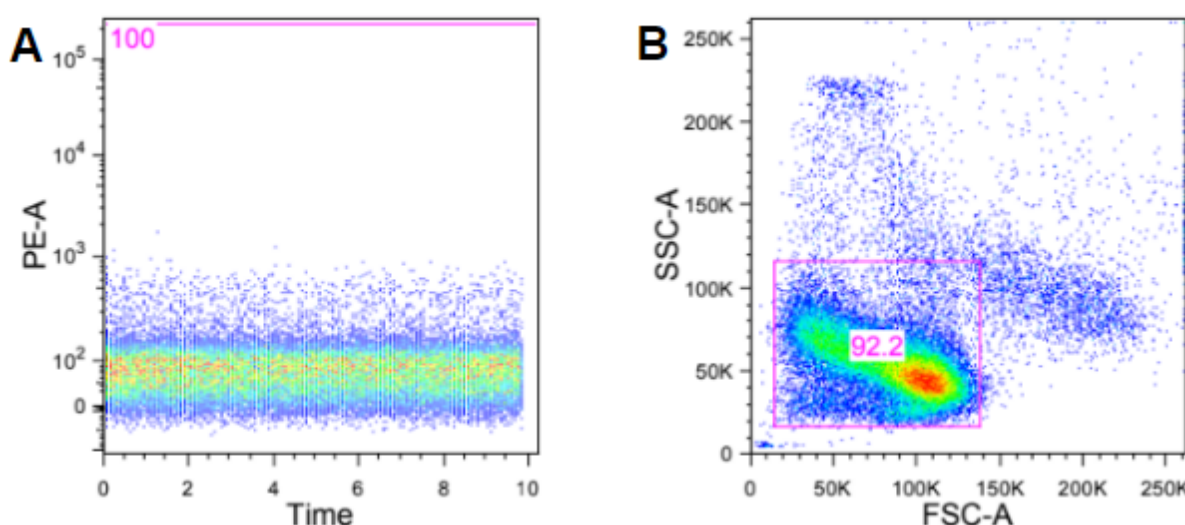
4.3 Padronização da quantificação da parasitemia de *P. falciparum* por citometria de fluxo

Amostras infectadas pelo *Plasmodium falciparum* foram analisadas para a verificação de qual diluição dos corantes melhor representa a parasitemia.

Como controle da marcação dos corantes, utilizamos amostras de hemácias não infectadas, sendo elas não marcadas e também coradas com as diferentes diluições de *VybrantGreen* e *VybrantViolet*.

Como estratégia de *gate*, selecionamos primeiramente todas as células com o mesmo padrão de aquisição ao longo do tempo (Figura 8A) e, posteriormente, por meio dos parâmetros de tamanho e granulosidade, delimitamos um *gate* na população de hemácias (Figura 8B).

Figura 8 - Estratégia de *gate* inicial para a análise de hemácias.

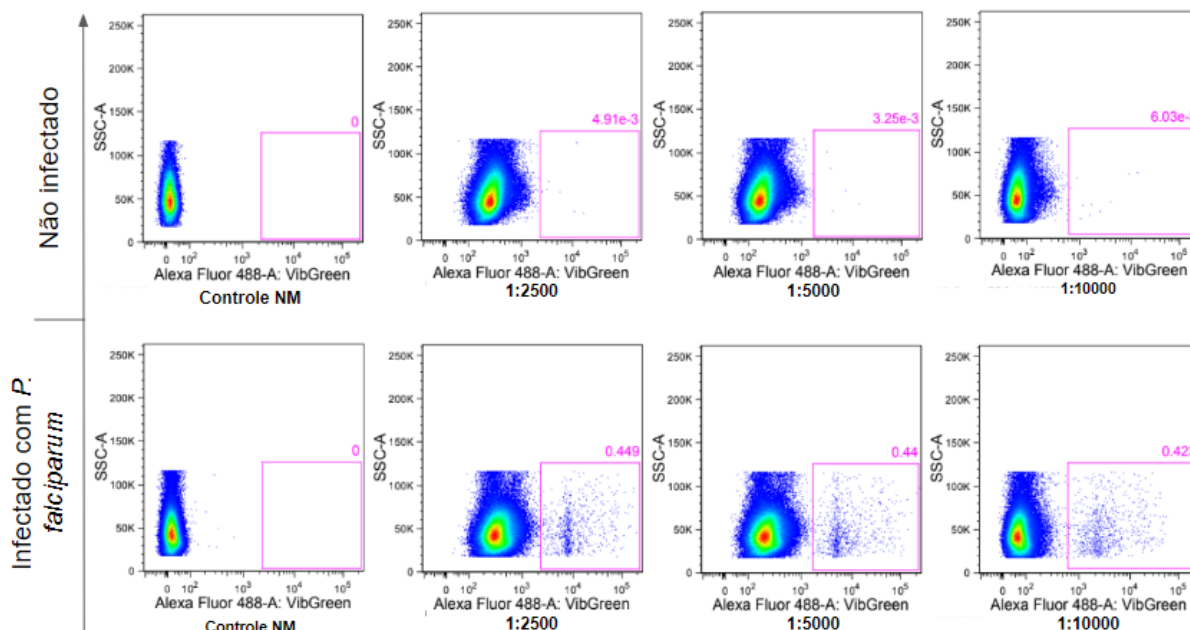


Fonte: Autoria própria

Conforme exibido nos painéis inferiores das figuras 9 (*VybrantGreen*) e 10 (*VybrantViolet*) (não marcado, diluição 1:2.500, 1:5.000, 1:10.000), podemos observar a frequência de células marcadas pelos corantes, que representam as células infectadas pelo *P. falciparum*. A delimitação do *gate* contendo eventos positivos para a marcação foi escolhida com base nas amostras não infectadas, porém marcadas com os corantes (painéis superiores de cada figura).

Com base na análise dos *Dot Plots* que representam os dados obtidos pela marcação com o corante *Vybrant DyeCycle Green* (Figura 9), observamos que utilizando qualquer diluição do marcador a frequência de células parasitadas é muito semelhante.

Figura 9 - Titulação do marcador *VibrantGreen* por citometria de fluxo.

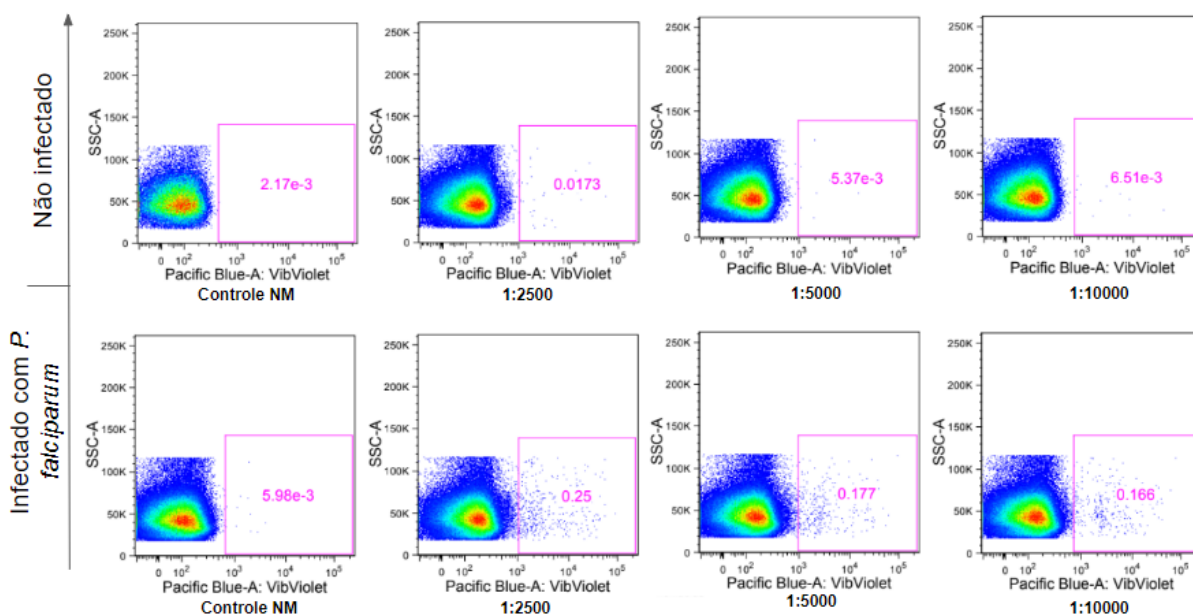


Nota: NM= Não marcado com corante *VybrantGreen*

Fonte: Autoria própria

Contudo, os dados obtidos da marcação com o corante *VybrantViolet* (Figura 10) mostram uma frequência menor de células marcadas/parasitadas em relação à marcação com *VybrantGreen* (Figura 9), independente da diluição utilizada do corante.

Figura 10 - Titulação do marcador *VibrantViolet* por citometria de fluxo.



Nota: NM= Não marcado com corante *VybrantViolet*

Fonte: Autoria própria

5. DISCUSSÃO

5.1 Enriquecimento dos reticulócitos

As baixas parasitemias típicas de *Plasmodium vivax* dificultam a cultura dos parasitas. Com o objetivo de enriquecer o cultivo, foi adaptado um protocolo de Nicolete (2017) para o enriquecimento de reticulócitos, onde avaliamos acrescentar o teste de densidade de Percoll para cada amostra utilizada, etapas de lavagens do sangue com KCl, teste de diferentes volumes do gradiente e padronização do hematócrito.

5.1.1 Padronização

Antes desta padronização, não eram realizadas as etapas de lavagens e verificação do hematócrito da amostra utilizada para o enriquecimento de reticulócitos, com isso, utilizando o protocolo de Nicolete (2017), obtivemos um enriquecimento de 2,3% de reticulócitos apenas, e para contornar esse baixo valor de reticulócitos decidimos testar a adição de etapas de lavagens e padronização do Ht.

As duas etapas de lavagens do sangue, em solução de KCl, permitiu um melhor enriquecimento do reticulócitos, aliado à padronização do gradiente de Percoll em tubos com 3 mL na proporção 1:1 (sangue:Percoll), que possibilitou uma visualização satisfatória do anel de reticulócitos.

Para a padronização do hematócrito sabe-se que cada indivíduo possui uma determinada quantidade de reticulócitos no sangue e essa quantidade recuperada pode variar após o processo de enriquecimento, contudo, definir o hematócrito ideal para o processo visando trabalhar com volumes compatíveis para a realização do gradiente de Percoll são fundamentais para a eficiência da técnica.

Inicialmente foi realizado um experimento ao hematócrito de 20%, porém o anel de reticulócitos em gradiente de Percoll não ficou evidente. Desse modo, foi testado Ht de 30%, que ficou bem definido tanto em tubo de 3 mL quanto 5 mL, entretanto, o anel de células ficou mais evidente no tubo de 3 mL. Ademais, no Ht de 50% a fase do Percoll não ficou límpida fator que pode indicar contaminação de eritrócitos maduros.

Assim como o estudo de Leonart (2009), envolvendo a maturação de reticulócitos armazenados em geladeira, neste trabalho, houve baixa variação da porcentagem de reticulócitos ao longo de uma semana, nos mostrando que estas células podem ser armazenadas e utilizadas posteriormente dentro deste período.

5.2 Descongelamento e cultura de *Plasmodium vivax*

Sobre o descongelamento dos parasitas de *Plasmodium vivax* para cultivo e enriquecimento de esquizontes foram realizadas três tentativas e apenas uma atingiu um volume suficiente para o enriquecimento dos esquizontes utilizando o gradiente de Percoll a 45%. Entretanto, após as etapas de lavagens o rendimento volumétrico foi baixo, partindo de 4 criotubos (8 mL) de sangue criopreservado. Desse modo, fica claro a dificuldade de realizar o cultivo de *P. vivax*.

Essa técnica de cultivo para posterior enriquecimento de esquizontes está em aprimoramento, pois apenas as formas de anel jovens normalmente sobrevivem ao processo de congelamento e descongelamento, e isso acaba dificultando a obtenção de uma cultura bem sucedida com boa parasitemia. Além disso, mesmo quando a cultura *ex vivo* inicia-se bem, há grande perda de parasitas viáveis ao longo do período de cultivo (RANGEL *et al.*, 2018).

5.3 Padronização da quantificação da parasitemia por citometria de fluxo

No total, para todas as amostras foram adquiridos 200.000 eventos. O corante *Vybrant Violet* apresentou marcação satisfatória, entretanto, o *Vybrant Green* apresentou o melhor resultado, com maior nitidez da população de células positivas/infectadas e maior frequência das mesmas. Diante disso, o corante *Vybrant Green* foi escolhido para quantificação da parasitemia por citometria de fluxo. O uso de *P. falciparum* facilitou as escolhas de corante e concentração ideal para os experimentos com *P. vivax*.

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo contribuem para a padronização da técnica de enriquecimento de reticulócitos para posterior uso em ensaios de invasão. Definimos

a necessidade das etapas de lavagem do sangue leucodepletado, o hematócrito na proporcionalidade do volume de sangue/Percoll de 3 mL. Além da constância do nível de reticulócitos armazenados na geladeira por 7 dias.

O uso de *P. falciparum* a fim de simular os futuros experimentos com *P. vivax* proporcionou a definição do corante e a diluição que deve ser utilizada para a quantificação da parasitemia por citometria de fluxo. Concluimos pela superioridade de *Vybrant DyeCycle Green* para essa finalidade.

O ensaio de invasão *ex vivo* com *P. vivax* não foi realizado, pois a cultura não atingiu a quantidade mínima de parasitas viáveis para o processo. Portanto, a dificuldade em cultivar *P. vivax* é um desafio a ser superado, não sabemos qual é o ponto crítico que ainda temos que melhorar na cultura e enriquecimento dos parasitas, mas uma alternativa é iniciar todo este processo com um número maior de amostras criopreservadas, uma vez que a parasitemia é baixa e apenas as formas jovens do parasito sobrevivem ao descongelamento. Desse modo, todos os testes que foram realizados ajudarão nos futuros estudos que envolvem ensaios de invasão com *P. vivax*.

7. REFERÊNCIAS

AMINO R.; THIBERGE S.; MARTIN B.; *et al.* Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nat Med**, v. 12, n. 2, p. 220-224, 2006.

BEI, A. K.; DESIMONE, T. M.; BADIANE, A. S. *et al.* A flow cytometry-based assay for measuring invasion of red blood cells by *Plasmodium falciparum*. **Am J Hematol**, v. 85, n. 4, p. 234-237, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dados para Cidadão. In: Saúde de A a Z: Malária - Situação epidemiológica da malária.** Disponível em: <https://public.tableau.com/app/profile/mal.ria.brasil#!/>. Acesso em: 26 set. de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Malária.** Brasília. Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria> Acesso em: 30 jan. de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde (2022). **Plano Nacional de Eliminação da Malária.** Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/malaria/elimina-malaria-brasil-plano-nacional-de-eliminacao-da-malaria/view> Acesso em: 24 set. de 2023

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológica da Malária**. Brasília, 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/situacao-epidemiologica-da-malaria>> Acesso em: 24 set. 2023.

CARLTON, J. M.; ADAMS, J. H. *et al.* Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nat Med**, v. 455, n. 7214, p. 757-763, 2008.

CHAN, L. J.; DIETRICH, M. H.; NGUITRAGOOL, W. *et al.* *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins for invasion into reticulocytes. **Cell Microbiol**, v. 22, n. 1, p. e13110, 2020.

CHAN, L.J.; GANDHIRAJAN, A.; CARIAS, L.L. *et al.* Naturally acquired blocking human monoclonal antibodies to *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein 2b. **Nat Commun**, v. 12, n. 1, p. 15-38, 2021.

CHENG, Y.; ZAK, O.; AISEN, P. *et al.* Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. **Cell**, v. 116, n. 4, p. 565-76, 2004.

COWMAN, A. F.; TONKIN, C. J.; THAM, W. H. *et al.* The molecular basis of erythrocyte invasion by Malaria parasites. **Cell Host Microbe**, v. 22, n. 2, p. 232–245, 2017.

COX, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasit Vectors**, v. 3, n. 1, p. 5, 2010.

DARWIN, A. M. P.; RUÍZ, J.A. PATARROYO, M.A. Reticulocytes: *Plasmodium vivax* target cells. **Bio Cell**, v. 105, n. 6, p. 251–260, 2013.

DE NIZ, M.; BURDA, P. C.; KAISER, G. *et al.* Progress in imaging methods: insights gained into *Plasmodium* biology. **Nat. Rev. Microbiol**, v. 15, n. 1, p. 37-54, 2017.

FEENEY, G. P.; CARTER, K.; MASTERS, G. S. *et al.* Changes in erythropoiesis in hereditary hemochromatosis are not mediated by HFE expression in nucleated red cells. **Haematol**, v. 90, n. 2, p. 180-187, 2005.

FERREIRA, M. U.; NOBREGA DE SOUSA, T.; RANGEL, G. W. *et al.* Monitoring *Plasmodium vivax* resistance to antimalarials: Persisting challenges and future directions. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, v. 15, n. 1, p. 9-24, 2021.

FIGUEIRA, E. A. G. **Mosquiteiros impregnados com inseticidas de longa duração no controle da malária no Amazonas: percepção da população em áreas de risco e avaliação do perfil de susceptibilidade dos vetores ao inseticida**. 2022. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.

GOLENDA, C. F.; LI, J.; ROSENBERG, R. Continuous in vitro propagation of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 13, p. 6786-6791, 1997.

GUNALAN, K.; ROWLEY, E. H.; MILLER, L. H. A Way Forward for Culturing *Plasmodium vivax*. **Trends Parasitol**, v. 36, n. 6, p. 512-519, 2020.

HESTER, J.; CHAN, E. R.; MENARD. *et al.* De novo assembly of a field isolate genome reveals novel *Plasmodium vivax* erythrocyte invasion genes. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 12, p. e2569, 2013.

IMADE, G. E.; BADUNG, B.; PAM, S. *et al.* Comparison of a new, affordable flow cytometric method and the manual magnetic bead technique for CD4 T-lymphocyte counting in a northern Nigerian setting. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 12, n. 1, p. 224-227, 2005.

KANJEE U.; RANGEL G. W.; CLARK M. A. *et al.* Molecular and cellular interactions defining the tropism of *Plasmodium vivax* for reticulocytes. **Curr Opin Microbiol**, v.46, n. 1, p. 109-115, 2018.

LEONART, M. S. S. A importância do controle de qualidade para a contagem de reticulócitos por métodos visual e automatizado. **Rev Bras Hematol. Hemoter**, v. 31, n. 5, p. 1, 2009.

LIM, C.; PEREIRA, L.; SHARDUL, P. *et al.* Improved light microscopy counting method for accurately counting *Plasmodium* parasitemia and reticulocytemia. **Am J Hematol**, v. 91, n. 8, p. 852-855, 2016.

MALLERET, B.; LI, A.; ZHANG, R. *et al.* *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. **Blood**, v. 125, n. 8, p. 1314-1324, 2015.

MALLERET, B.; RÉNIA, L.; & RUSSELL, B. The unhealthy attraction of *Plasmodium vivax* to reticulocytes expressing transferrin receptor 1 (CD71). **Int J Parasitol**, v. 47, n. 7, p. 379–383, 2017.

MILLER, L. H.; MASON, S.J.; CLYDE, D.F. *et al.* The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. **N Engl J Med**, v. 295, n. 6, p. 302-304, 1976.

MOREIRA, C. M., ABO-SHEHARA, M.; PRICE, R. N. *et al.* A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. **Malar J**, v. 14, n. 1, p. 360, 2015.

MUELLER, I.; GALINSKI, M.; BAIRD, J.K. *et al.* Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet Infect Dis**, v. 9, n. 9, p. 555-566, 2009.

NEAFSEY, D. E.; GALINSKY, K.; JIANG, R. H. *et al.* The malaria parasite *Plasmodium vivax* exhibits greater genetic diversity than *Plasmodium falciparum*. **Nat Genet**, v. 44, n. 9, p. 1046-1050, 2012.

NICOLETE, V. C. **Anticorpos contra Duffy Binding Protein (PvDBP) e proteção contra malária vivax na Amazônia rural brasileira**. 2017. 186 f. Tese (Doutorado

em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

PAN, B. T.; JOHNSTONE, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. **Cell**, v. 33, n. 3, p. 967-978, 1983.

PANICHAKUL, T.; SATTABONGKOT, J.; CHOTIVANICH, K. *et al.* Production of erythropoietic cells in vitro for continuous culture of *Plasmodium vivax*. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 1, p. 1551–1557, 2007.

PIMENTA, P. F.; ORFANO, A. S.; BAHIA, A. C. *et al.* An overview of malaria transmission from the perspective of Amazon Anopheles vectors. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 23-47, 2015.

RANGEL, G. W.; CLARK, M. A.; KANJEE, U. *et al.* Enhanced *ex vivo Plasmodium vivax* intraerythrocytic enrichment and maturation for rapid and sensitive parasite growth assays. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 4, p. e02519-17, 2018.

RUSSELL, B.; SUWANARUSK, R.; BORLON, C. *et al.* A reliable *ex vivo* invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax*. **Blood**, v. 118, n. 13, p. 74-81, 2011.

RUSSELL, B.; SUWANARUSK, R.; MALLERET, B. *et al.* Human *ex vivo* studies on asexual *Plasmodium vivax*: the best way forward. **Int J Parasitol**, v. 42, n. 12, p. 1063-1070, 2012.

SHAW-SALIBA, K.; THOMSON-LUQUE, R.; OBALDÍA, N. *et al.* Insights into an Optimization of *Plasmodium vivax* Sal-1 In Vitro Culture: The Aotus Primate Model. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 7, p. e0004870, 2016.

THOMSON-LUQUE, R.; BAUTISTA, J. M. Home Sweet Home: *Plasmodium vivax*-Infected Reticulocytes-The Younger the Better? **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 11, n.1, p. 6751-6756, 2021.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976.

WEED, R. I.; LACELLE, P. L.; EDWARD, W. M. Metabolic dependence of red cell deformability. **J Clin Invest**, v. 48, n. 5, p. 795-809, 1969.

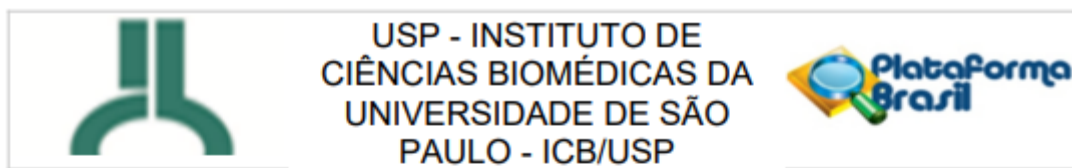
WHO - World Health Organization. Genebra: WHO, 2022. Acesso: 23 set. 2023.

WHO - World Health Organization. Genebra: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/malaria?gclid=Cj0KCQjwvL-oBhCxARIsAHkOiu3iSwOYvbgUlxDpwwjyTsrnCqijSsR8Nw1K25CCRKUSVfjO2z__UcaArY2EALw_wcB> Acesso: 23 set. 2023.

WHO - World Health Organization. World Malaria Report 2022. Genebra: WHO, 2022. Acesso: 23 set. 2023.

WOLDEAREGAI, T.G.; KREMSNER, P.G.; KUN, J.F. *et al.* *Plasmodium vivax* malaria in Duffy-negative individuals from Ethiopia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 107, n. 5, p. 328-331, 2013.

8. ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Anticorpos anti-PvRBP2b adquiridos naturalmente, bloqueio de invasão de glóbulos vermelhos e proteção contra malária por Plasmodium vivax.

Pesquisador: Natália Soares Ferreira

Área Temática: Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 1

CAAE: 63942222.9.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Patrocinador Principal: FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.710.490

Apresentação do Projeto:

A malária presente em certas regiões do Brasil está concentrada na região amazônica, onde a maioria dos casos reportados estão associados principalmente à infecção pela espécie Plasmodium vivax (P. vivax). Dos 145 mil casos registrados no ano de 2021, 90% foram devido ao P. vivax (Ministério da Saúde do Brasil, 2022). Do ciclo de vida do parasito, a forma assexuada do estágio sanguíneo é a responsável pela manifestação dos sinais e sintomas típicos da malária. A doença pode se manifestar de maneira diferente de acordo com o nível da parasitemia e espécie do parasito, tempo da doença, resposta imune adquirida, idade do paciente, assim como fatores genéticos (Basu & Sahi, 2017). Na infecção pelo P. vivax, das células vermelhas do sangue, os reticulócitos são preferencialmente infectados pelo parasito, estando em uma frequência de aproximadamente 1 a 2% do total de eritrócitos (Mueller et al., 2009), causando uma parasitemia baixa, que raramente excede 2% (Dayanand et al., 2018). Uma das principais proteínas do P. vivax estudadas é a proteína de ligação ao antígeno Duffy (PvDBP), que se liga no receptor DARC presente nas células vermelhas do sangue, sendo considerada uma interação essencial para o processo de invasão (Adams & Mueller, 2017). Este grande foco de estudo se deu principalmente pelo fato de indivíduos com ausência genética deste receptor serem resistentes à infecção (Mueller et al., 2009), uma vez que são raros os casos de malária vivax em certas regiões da África onde há predominância destas populações (Zimmerman et al., 2013).

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

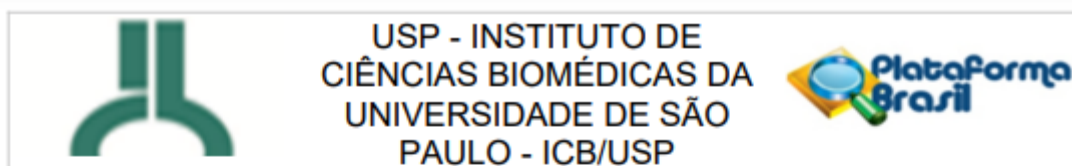
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

CEP: 05.508-000

E-mail: cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 5.710.490

Contudo, o *P. vivax* parece ter superado, ao menos parcialmente, este bloqueio da invasão em regiões da África e das Américas (Zimmerman et al., 2013). Trabalhos mostraram que mesmo indivíduos DARC-negativos podem ser infectados pelo parasito (Ryan et al., 2006; Cavasini et al., 2007), indicando a presença de outro possível receptor fundamental para a invasão. Recentemente foi identificada a proteína de ligação ao reticulócito (PvRBP2b), que faz parte da família de adesinas PvRBP, como a responsável pela invasão celular por se ligar ao receptor de transferrina-1 (TfR1), expresso somente em reticulócitos (Gruszczyk et al., 2018a). O TfR1, também conhecido como CD71, está presente em células vermelhas jovens, com a expressão sendo perdida conforme estas células sofrem o processo de maturação em normócitos (Gruszczyk et al., 2018a). O processo de invasão celular pelo *P. vivax* pode ser impedido por anticorpos específicos para a proteína PvRBP2b (Gruszczyk et al., 2018) e, uma vez que muitos estudos mostraram a presença destes anticorpos no sangue de indivíduos expostos à malária, evidências sobre a associação destes anticorpos com a redução do risco de malária começaram a surgir. Até mesmo crianças expostas em áreas de intensa transmissão, na Papua Nova Guiné, e com altos níveis de anticorpos para a PvRBP2b, mostraram possuir menos risco de apresentar a malária vivax clínica durante 16 meses de seguimento (Franca et al., 2016). Essa proteção também já foi vista em indivíduos moradores de áreas de baixa transmissão no Brasil e Tailândia (He et al., 2019). Estudos já mostraram que apenas uma pequena fração de anticorpos que reconhecem a proteína PvDBP, detectados em sorologia, possuem atividade bloqueadora com capacidade de reduzir a invasão das células pelo *P. vivax* (Grimberg et al., 2007; King et al., 2008; Nicolette et al., 2016; Carias et al., 2019). Em relação à proteína PvRBP2b, epítopos presentes no domínio N-terminal são reconhecidos por três anticorpos monoclonais, adquiridos pela imunização de camundongos, capazes de inibir parcialmente a ligação e invasão de reticulócitos pelo *P. vivax* em ensaios ex vivo (Gruszczyk et al., 2018a; Gruszczyk et al., 2018b). Diante disso, a triagem de um grande número de amostras clínicas para ensaios funcionais é necessária, para a determinação da frequência de pessoas expostas à malária que desenvolvem anticorpos específicos para estes epítopos da PvRBP2b com atividade de bloqueio da invasão. Uma vez que muitas pessoas que vivem nas áreas endêmicas da região amazônica sofrem constantes episódios de malária, enquanto outras parecem possuir um menor risco de adquirir a doença, acreditamos que essa heterogeneidade do risco de malária possa estar associada com o desenvolvimento natural de anticorpos protetores, específicos para certas proteínas do parasito, que são essenciais para o processo de invasão das células vermelhas do sangue. Sendo assim, nosso estudo pretende testar

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

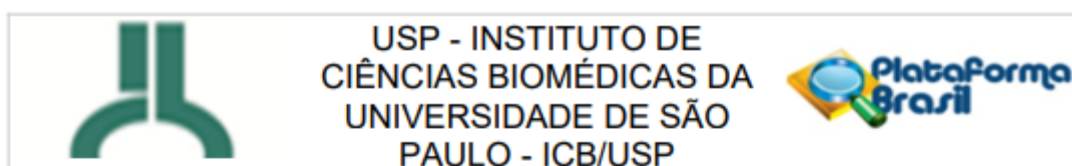
CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 5.710.490

se anticorpos anti-PvRBP2b adquiridos naturalmente competem por epítomos reconhecidos por anticorpos monoclonais protetores, se possuem capacidade de bloqueio da invasão, e se predizem o risco de malária vivax clínica. A caracterização da resposta destes anticorpos será realizada utilizando amostras de uma coorte de indivíduos moradores de uma cidade endêmica para malária localizada na Amazônia brasileira.

Objetivo da Pesquisa:

Em linhas gerais, propõe investigar a resposta de anticorpos a proteínas ligantes a reticulócitos (PvRBP) em amostras de sangue oriundas de biorepositório de pacientes com infecção aguda de *Plasmodium vivax*, verificar a atividade de bloqueio de invasão e correlação com a proteção contra a malária.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Uma vez que as amostras já foram coletadas e armazenadas, cadastradas em biorepositório, não existem mais riscos aos participantes durante a coleta, mas ainda existem os riscos de exposição de dados pessoais, como a perda da confidencialidade dos dados e de exames. Contudo, como medidas para redução do risco, o acesso aos dados será limitado apenas à equipe de pesquisa, com os registros e identificação da amostra sendo codificados.

Como benefícios, a pesquisa oferecerá benefício indireto, coletivo, uma vez que o conhecimento adquirido sobre a capacidade de proteção de anticorpos adquiridos naturalmente será mais aprofundado, possibilitando descobertas que num potencial futuro poderá ajudar no controle da infecção malária.

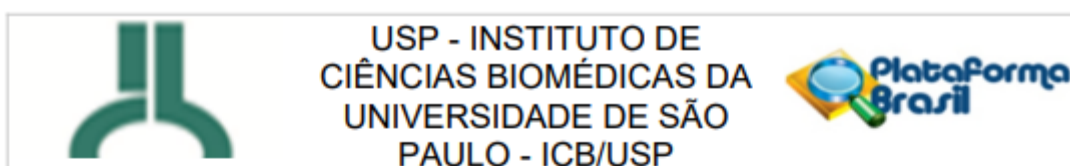
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa relevante e importante para a área de pesquisa em que se insere: estabelecer a importância de anticorpos específicos gerados durante infecção aguda na proteção contra malária. Os resultados poderão gerar dados para estabelecimento de uma terapia específica à base de anticorpos monoclonais. A proponente e o grupo de pesquisa tem experiência na área e tem colaboração com grupos do exterior e do Brasil. O projeto está bem elaborado e apresentado. Os princípios, diretrizes e regras para a condução de pesquisas clínicas em seres humanos foram contemplados. O projeto atende as exigências da Resolução 466/2012.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória não são necessários neste caso, uma vez que foram

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415		CEP: 05.508-000
Bairro: Cidade Universitária		
UF: SP	Município: SAO PAULO	
Telefone: (11)3091-7733	E-mail: cep@icb.usp.br	



Continuação do Parecer: 5.710.490

aplicados no momento da coleta para composição do biorrepositório. O atual projeto propõe dispensa de TCLE uma vez que o estudo irá utilizar amostras oriundas de biorrepositório autorizado para uso em outros projetos científicos, com os respectivos TCLEs dos participantes da pesquisa já tendo sido obtidos. O atual estudo utilizará informações clínicas e

demográficas disponíveis, sem a necessidade de coleta de mais dados e de material biológico. O investigador principal e demais colaboradores envolvidos no estudo acima se comprometem, individual e coletivamente, a utilizar os dados provenientes deste, apenas para os fins descritos no projeto, cumprindo com o sigilo e confidencialidade dos dados coletados.

Recomendações:

Aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto é de relevância, está bem apresentado. Nenhuma pendência.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação às amostras biológicas, em não havendo ainda um biorrepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Declaração de Pesquisadores	Carta_Anuencia_Pesquisadores_NSF.pdf	05/10/2022 07:41:30	JANICLEIDE DE LIRA MONTEIRO	Aceito
Outros	Decl_ICB_NSF.pdf	05/10/2022 07:40:24	JANICLEIDE DE LIRA MONTEIRO	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2015991.pdf	27/09/2022 16:36:40		Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_NSF.pdf	26/09/2022 14:05:02	Natália Soares Ferreira	Aceito
Outros	Autorizacao_biorrepositorio_MUF.pdf	16/09/2022 15:35:41	Natália Soares Ferreira	Aceito

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

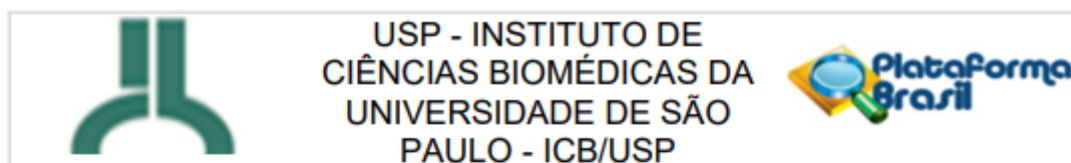
CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 5.710.490

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Autorizacao_para_uso_material_human o_NSF.pdf	16/09/2022 15:28:48	Natália Soares Ferreira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_Dispenza_TCLE_NSF.pdf	16/09/2022 15:28:37	Natália Soares Ferreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_NSF.pdf	16/09/2022 15:26:48	Natália Soares Ferreira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

SAO PAULO, 19 de Outubro de 2022

Assinado por:
Camila Squarzoni Dale
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

CEP: 05.508-000

E-mail: cep@icb.usp.br



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP
PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa:
Anticorpos anti-PvRBP2b adquiridos naturalmente, bloqueio de invasão de glóbulos vermelhos e proteção contra malária por Plasmodium vivax.

Informações Preliminares

Responsável Principal	
CPF/Documento: 396.972.198-93	Nome: Natália Soares Ferreira
Telefone: 15997456405	E-mail: nataliasofe@gmail.com

Instituição Proponente	
CNPJ:	Nome da Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

É um estudo internacional? Não

Equipe de Pesquisa

CPF/Documento	Nome
318.771.128-60	Vanessa Cristina Nicoletti
083.226.418-00	Marcelo Urbano Ferreira
104.498.986-60	PRISCILA RODRIGUES CALIL
832.731.232-49	LUIZA BARBOSA BARROS

Área de Estudo

Área Temática Especial

Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 2. Ciências Biológicas
- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Ciências Básicas

Título Público da Pesquisa: Anticorpos anti-PvRBP2b adquiridos naturalmente, bloqueio de invasão de glóbulos vermelhos e proteção contra malária por Plasmodium vivax.

Contato Público			
CPF/Documento	Nome	Telefone	E-mail
396.972.198-93	Natália Soares Ferreira	15997456405	nataliasofe@gmail.com

Contato Científico: Natália Soares Ferreira

Desenho de Estudo / Apoio Financeiro

Desenho:

Aproximadamente, 180 amostras de sangue, oriundas de biorrepositório, de indivíduos com infecção aguda por *P. vivax*, moradores de Mâncio Lima, região endêmica na Amazônia brasileira (Ladeia-Andrade et al., 2019), serão utilizadas para a caracterização da resposta de anticorpos específicos para a proteína PvRBP2b. Para calcularmos a prevalência de indivíduos que possuem anticorpos específicos para membros da família PvRBP, seis proteínas recombinantes serão utilizadas como antígeno de captura nos ensaios de ELISA. As amostras que possuírem altos níveis de anticorpos anti-PvRBP2b serão testadas nos ensaios de competição com três anticorpos monoclonais murinos, que sabidamente possuem forte atividade de bloqueio da invasão, e que têm como alvo diferentes epítomos presentes na PvRBP2b. Para os ensaios de bloqueio da invasão, serão utilizadas as amostras de plasma com porcentagem de competição igual ou acima de 80% para a purificação de anticorpos anti-PvRBP2b. Reticulócitos enriquecidos (obtidos de doadores saudáveis) serão incubados com reticulócitos infectados por *P. vivax* (obtidos dos indivíduos com malária moradores de Mâncio Lima) na proporção de 1:1. Diferentes concentrações dos anticorpos anti-PvRBP2b, purificados do pool de 5 amostras de plasma, serão testadas para a capacidade de bloqueio da invasão do *P. vivax*. A contagem de células será feita por citometria de fluxo, uma vez que o DNA do parasito será marcado, além de esfregaços corados com Giemsa, que também serão realizados para a contagem diferencial dos estágios do parasito por microscopia. As análises estatísticas serão realizadas nos programas Stata (versão 15.1) ou R (versão 3.3.0), estabelecendo um nível de significância estatística de 5%, intervalo de confiança de 95%, com estimação do intervalo interquartil quando apropriado para o dado.

Apoio Financeiro

CNPJ	Nome	E-mail	Telefone	Tipo
56.577.059/0001-00	FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA		1130164988	Institucional Secundário

Palavra Chave

Palavra-chave
malária
Plasmodium vivax
PvRBP2b
anticorpos protetores

Detalhamento do Estudo

Resumo:

A Amazônia é uma das áreas endêmicas de malária causada principalmente pelo *Plasmodium vivax*. Muitas pessoas que vivem nas áreas endêmicas desta região sofrem constantes episódios de malária, enquanto outras, parecem possuir um risco menor de adquirir a doença. Essa heterogeneidade do risco de malária pode estar associada com o desenvolvimento natural de anticorpos protetores específicos para certas proteínas do parasito, que são essenciais para o processo de invasão das células vermelhas do sangue. Dentro da família de proteínas ligantes a reticulócitos (PvRBP), já foi mostrado que a proteína PvRBP2b, expressa durante o estágio sanguíneo tardio, possui capacidade de se ligar ao receptor de transferrina-1 (TfR1), altamente expresso em reticulócitos, células alvo do *P. vivax*, e que anticorpos anti-PvRBP2b bloqueiam com sucesso a entrada do parasito. Diante disso, pretendemos identificar anticorpos específicos para a proteína PvRBP2b, adquiridos naturalmente, que tenham capacidade de bloquear a invasão do *P. vivax* em ensaios *ex vivo*, e analisar se a aquisição desta resposta imune específica está associada com a proteção contra a malária na Bacia Amazônica brasileira.

Introdução:

A malária presente em certas regiões do Brasil está concentrada na região amazônica, onde a maioria dos casos reportados estão associados principalmente à infecção pela espécie *Plasmodium vivax* (*P. vivax*). Dos 145 mil casos registrados no ano de 2021, 90% foram devido ao *P. vivax* (Ministério da Saúde do Brasil, 2022). Do ciclo de vida do parasito, a forma assexuada do estágio sanguíneo é a responsável pela manifestação dos sinais e sintomas típicos da malária. A doença pode se manifestar de maneira diferente de acordo com o nível da parasitemia e espécie do parasito, tempo da doença, resposta imune adquirida, idade do paciente, assim como fatores genéticos (Basu & Sahi, 2017). Na infecção pelo *P. vivax*, as células vermelhas do sangue, os reticulócitos são preferencialmente infectados pelo parasito, estando em uma frequência de aproximadamente 1 a 2% do total de eritrócitos (Mueller et al., 2009), causando uma parasitemia baixa, que raramente excede 2% (Dayanand et al., 2018). Uma das principais proteínas do *P. vivax* estudadas é a proteína de ligação ao antígeno Duffy (PvDBP), que se liga no receptor DARC presente nas células vermelhas do sangue, sendo considerada uma interação essencial para o processo de invasão (Adams & Mueller, 2017). Este grande foco de estudo se deu principalmente pelo fato de indivíduos com ausência genética deste receptor serem resistentes à infecção (Mueller et al., 2009), uma vez que são raros os casos de malária *vivax* em certas regiões da África onde há predominância destas populações (Zimmerman et al., 2013). Contudo, o *P. vivax* parece ter superado, ao menos parcialmente, este bloqueio da invasão em regiões da África e das Américas (Zimmerman et al., 2013). Trabalhos mostraram que mesmo indivíduos DARC-negativos podem ser infectados pelo parasito (Ryan et al., 2006; Cavanini et al., 2007), indicando a presença de outro possível receptor fundamental para a invasão. Recentemente foi identificada a proteína de ligação ao reticulócito (PvRBP2b), que faz parte da família de adesinas PvRBP, como a responsável pela invasão celular por se ligar ao receptor de transferrina-1 (TfR1), expresso somente em reticulócitos (Gruszczyk et al., 2018a). O TfR1, também conhecido como CD71, está presente em células vermelhas jovens, com a expressão sendo perdida conforme estas células sofrem o processo de maturação em normócitos (Gruszczyk et al., 2018a). O processo de invasão celular pelo *P. vivax* pode ser impedido por anticorpos específicos para a proteína PvRBP2b (Gruszczyk et al., 2018) e, uma vez que muitos estudos mostraram a presença destes anticorpos no sangue de indivíduos expostos à malária, evidências sobre a associação destes anticorpos com a redução do risco de malária começaram a surgir. Até mesmo crianças expostas em áreas de intensa transmissão, na Papua Nova Guiné, e com altos níveis de anticorpos para a PvRBP2b, mostraram possuir menos risco de apresentar a malária *vivax* clínica durante 16 meses de seguimento (Franca et al., 2016). Essa proteção também já foi vista em indivíduos moradores de áreas de baixa transmissão no Brasil e Tailândia (He et al., 2019). Estudos já mostraram que apenas uma pequena fração de anticorpos que reconhecem a proteína PvDBP, detectados em sorologia, possuem atividade bloqueadora com capacidade de reduzir a invasão das células pelo *P. vivax* (Grimberg et al., 2007; King et al., 2008; Nicolette et al., 2016; Carias et al., 2019). Em relação à proteína PvRBP2b, epítomos presentes no domínio N-terminal são reconhecidos por três anticorpos monoclonais, adquiridos pela imunização de camundongos, capazes de

inibir parcialmente a ligação e invasão de reticulócitos pelo *P. vivax* em ensaios ex vivo (Gruszczyk et al., 2018a; Gruszczyk et al., 2018b). Diante disso, a triagem de um grande número de amostras clínicas para ensaios funcionais é necessária, para a determinação da frequência de pessoas expostas à malária que desenvolvem anticorpos específicos para estes epítopos da PvRBP2b com atividade de bloqueio da invasão. Uma vez que muitas pessoas que vivem nas áreas endêmicas da região amazônica sofrem constantes episódios de malária, enquanto outras parecem possuir um menor risco de adquirir a doença, acreditamos que essa heterogeneidade do risco de malária possa estar associada com o desenvolvimento natural de anticorpos protetores, específicos para certas proteínas do parasito, que são essenciais para o processo de invasão das células vermelhas do sangue. Sendo assim, nosso estudo pretende testar se anticorpos anti-PvRBP2b adquiridos naturalmente competem por epítopos reconhecidos por anticorpos monoclonais protetores, se possuem capacidade de bloqueio da invasão, e se predizem o risco de malária vivax clínica. A caracterização da resposta destes anticorpos será realizada utilizando amostras de uma coorte de indivíduos moradores de uma cidade endêmica para malária localizada na Amazônia brasileira.

Hipótese:

A hipótese deste trabalho é de que a taxa de desenvolvimento da resposta protetora de anticorpos nos indivíduos pode ser um dos principais fatores envolvidos na heterogeneidade do risco de malária na Bacia Amazônica.

Objetivo Primário:

Investigar a aquisição relacionada à idade de respostas de anticorpos a um antígeno-chave do estágio sanguíneo assexuado do *P. vivax* e sua associação com o risco de malária na Bacia Amazônica.

Objetivo Secundário:

- Avaliação da competição pela ligação a epítopos entre anticorpos anti-PvRBP2b humanos, adquiridos naturalmente, e anticorpos monoclonais murinos específicos;- Realização de ensaios para testar a capacidade de bloqueio da invasão ex-vivo do *P. vivax* por anticorpos anti-PvRBP2b purificados adquiridos naturalmente;- Análise sobre a predição do risco de malária vivax clínica subsequente.

Metodologia Proposta:

Em resumo, aproximadamente, 180 amostras de sangue (oriundas de biorrepositório) de indivíduos com infecção aguda por *P. vivax*, moradores de Mâncio Lima, região endêmica na Amazônia brasileira, serão utilizadas para a caracterização da resposta de anticorpos específicos para a proteína PvRBP2b. Primeiramente, para calcular a prevalência de indivíduos, de acordo com a idade, que possuem anticorpos específicos para membros da família PvRBP, seis proteínas recombinantes serão utilizadas como antígeno de captura, sendo elas: a PvRBP1a, PvRBP1b, PvRBP2a, PvRBP2b, PvRBP2c e PvRBP2P-2. Para os ensaios de ELISA, a detecção de anticorpos IgG específicos utilizando as amostras de plasma será realizada em placas high-binding de 96 poços, contendo as diferentes proteínas recombinantes, incubadas em concentrações otimizadas para a captura de sinal máximo. Os resultados serão expressos como índice de reatividade, utilizando como cut-off 20 amostras de indivíduos nunca expostos à malária. As amostras que possuírem altos níveis de anticorpos anti-PvRBP2b serão testadas nos ensaios de competição com três anticorpos monoclonais murinos, que sabidamente possuem forte atividade de bloqueio da invasão, e que têm como alvo diferentes epítopos presentes na PvRBP2b. Para isso, as placas de ELISA serão incubadas com a proteína PvRBP2b e com as amostras de plasma contendo altos níveis de anti-PvRBP2b, e após lavagens, os anticorpos monoclonais murinos biotinilados serão adicionados. Assim, a presença de sinal, devido a ligação da estreptavidina conjugada à peroxidase, será quantificada para verificarmos o nível da competição dos anticorpos humanos com os anticorpos murinos pela ligação aos epítopos presentes na proteína PvRBP2b. Para os ensaios de bloqueio da invasão, serão utilizadas as amostras de plasma com porcentagem de competição igual ou acima de 80% para a purificação de anticorpos anti-PvRBP2b. Essa purificação será realizada a partir da junção de 5 amostras de plasma, que serão filtradas e incubadas com CNBR-activated sepharose acoplada com a proteína recombinante PvRBP2b. Os anticorpos específicos serão eluídos, dialisados, filtrados e concentrados. Para os ensaios de invasão, em placas de 96 poços serão incubados reticulócitos enriquecidos, obtidos de doadores saudáveis, juntamente com reticulócitos infectados, na proporção de 1:1. Diferentes concentrações dos anticorpos anti-PvRBP2b, purificados do pool de 5 amostras de plasma, serão testadas para a capacidade de bloqueio da invasão do *P. vivax*. O anticorpo IgG monoclonal anti-PvDBP servirá como controle positivo da atividade de bloqueio, e outro monoclonal específico para a toxina telânica será utilizado como controle negativo. Além disso, citocalasina D, que impossibilita a entrada do parasito na célula, também será utilizada como controle positivo do bloqueio da invasão. A contagem de células será realizada por citometria de fluxo e, para isso, o DNA do parasito será marcado, permitindo a distinção dos estágios uninucleados e multinucleados do *P. vivax*. Esmregaços das amostras de cultura serão realizados a partir da centrifugação das células, sendo marcados com Giemsa e utilizados para a contagem diferencial dos estágios do parasito por microscopia. As análises estatísticas serão realizadas nos programas Stata (versão 15.1) ou R (versão 3.3.0). Dados de proporções serão comparados pelo teste padrão 2 ou Mantel-Haenszel 2 para tendência linear, enquanto os dados de variáveis contínuas serão comparados utilizando o teste não-paramétrico Mann-Whitney U. As correlações serão analisadas pelo teste não-paramétrico de correlação de Spearman. Será estabelecido um nível de significância estatística de 5%, intervalo de confiança de 95%, com estimação do intervalo interquartil quando apropriado para o dado. Para a comparação do tempo do surgimento do primeiro episódio de malária vivax clínica com os níveis variáveis de anticorpos específicos, uma análise de sobrevivência será realizada.

Critério de Inclusão:

Do biorrepositório, apenas amostras coletadas durante a infecção aguda por *P. vivax* serão utilizadas nos ensaios de estudo dos anticorpos. Para os ensaios de invasão ex vivo, apenas amostras de sangue de adultos, de ambos os sexos, com parasitemia acima de duas cruzes serão utilizadas em nossos ensaios.

Critério de Exclusão:

Amostras que não apresentarem parasitos viáveis serão excluídas dos ensaios de invasão ex vivo.

Riscos:

Uma vez que as amostras já foram coletadas e armazenadas, cadastradas em biorrepositório, não existem mais riscos aos participantes durante a coleta, mas ainda existem os riscos de exposição de dados pessoais, como a perda da confidencialidade dos dados e de exames. Contudo, como medidas para redução do risco, o acesso aos dados serão limitados apenas à equipe de pesquisa, com os registros e identificação da amostra sendo codificados.

Benefícios:

Como benefícios, a pesquisa oferecerá benefício indireto, coletivo, uma vez que o conhecimento adquirido sobre a capacidade de proteção de anticorpos adquiridos naturalmente será mais aprofundado, possibilitando descobertas que num potencial futuro poderá ajudar no controle da infecção malárica.

Metodologia de Análise de Dados:

As análises estatísticas serão realizadas nos programas Stata (versão 15.1) ou R (versão 3.3.0). Dados de proporções serão comparados pelo teste padrão 2 ou Mantel-Haenszel 2 para tendência linear, enquanto os dados de variáveis contínuas serão comparados utilizando o teste não-paramétrico Mann-Whitney U. As correlações serão analisadas pelo teste de correlação não-paramétrico de Spearman. Será estabelecido um nível de significância estatística de 5%, intervalo de confiança de 95%, com estimação do intervalo interquartil quando apropriado para o dado. Para a comparação do tempo do surgimento do primeiro episódio de malária vivax clínica com os níveis variáveis de anticorpos específicos, uma análise de sobrevivência será realizada. A malária vivax clínica será constatada em indivíduo que apresentar infecção pelo *P. vivax* confirmada em laboratório, como também alguns dos sinais e sintomas típicos, tais

como febre e dor de cabeça, reportados no momento do diagnóstico ou nas últimas 48 horas. Como forma de controlar o polimorfismo de CYP2D6, os indivíduos serão agrupados de acordo com o escore de atividade previsto, em $< 1,0$ ou $> 1,0$ (Gaedigk et al., 2008). Além disso, serão utilizados modelos de riscos proporcionais de Cox para comparar as razões de risco do tempo até o primeiro episódio clínico de malária vivax através dos níveis de anticorpos ou porcentagens de competição de anticorpos, utilizando ajustes para a idade dos indivíduos (estratificada como <13 , 13 a 20, 21 a 40, e >40 anos), sexo, tipo de tratamento, e atividade de CYP2D6 (como $< 1,0$ ou $> 1,0$).

Desfecho Primário:

Espera-se encontrar relação entre a presença de anticorpos bloqueadores da invasão do *P. vivax* com o menor risco em se contrair a malária clínica.

Tamanho da Amostra no Brasil: 180

Países de Recrutamento		
País de Origem do Estudo	País	Nº de participantes da pesquisa
Sim	BRASIL	180

Outras Informações

Haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc)?

Sim

Detalhamento:

Para a classificação dos indivíduos que adquiriram malária ou não após a primeira coleta e a relação com a proteção via anticorpos, serão consultados os dados clínicos e demográficos. Como os indivíduos serão agrupados, dados sobre a idade (estratificada como 13, 13 a 20, 21 a 40, e >40 anos), sexo, tipo de tratamento e atividade de CYP2D6 serão utilizados.

Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa:

180

Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro

ID Grupo	Nº de Indivíduos	Intervenções a serem realizadas
Grupo único	180	uso das amostras de sangue já coletadas

O Estudo é Multicêntrico no Brasil?

Não

Propõe dispensa do TCLE?

Sim

Justificativa:

O atual projeto propõe dispensa de TCLE uma vez que o estudo irá utilizar amostras oriundas de biorrepositório autorizado para uso em outros projetos científicos, com os respectivos TCLEs dos participantes da pesquisa já tendo sido obtidos. O atual estudo utilizará informações clínicas e demográficas disponíveis, sem a necessidade de coleta de mais dados e de material biológico. O investigador principal e demais colaboradores envolvidos no estudo acima se comprometem, individual e coletivamente, a utilizar os dados provenientes deste, apenas para os fins descritos no projeto, cumprindo com o sigilo e confidencialidade dos dados coletados.

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?

Não

Cronograma de Execução

Identificação da Etapa	Início (DD/MM/AAAA)	Término (DD/MM/AAAA)
Testes de competição entre anticorpos humanos específicos e os anticorpos murinos monoclonais	02/01/2023	28/04/2023
Purificação dos anticorpos bloqueadores e confirmação da especificidade	01/04/2023	31/05/2023
Redação de relatórios e comunicações científicas	01/09/2023	31/10/2023
Padronização da cultura de <i>P. vivax</i> e realização dos ensaios de bloqueio da invasão ex vivo	01/05/2023	31/08/2023
Deteção dos anticorpos específicos para seis proteínas recombinantes da PvRBP	01/12/2022	28/04/2023
Organização dos protocolos, materiais e amostras selecionadas para o estudo	01/11/2022	30/11/2022
Análise dos dados para a predição do risco de malária vivax	01/07/2023	29/09/2023

Orçamento Financeiro

Identificação de Orçamento	Tipo	Valor em Reais (R\$)
Total em R\$		

Data de Submissão do Projeto: 27/09/2022

Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2015991.pdf

Versão do Projeto: 1

Reagentes e materiais	Outros	R\$ 100.000,00
Bolsa	Bolsas	R\$ 75.600,00
Total em R\$		R\$ 175.600,00

Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisador:

As amostras que serão utilizadas são de biorepositório, que foram coletadas durante outro projeto aprovado, possuindo o número de registro no ClinicalTrials.gov NCT02691910, CAAE nº 27470714.3.0000.5467, protocolo CEPIS nº 1209/2014, sob responsabilidade do prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira.

Bibliografia:

Adams, J.H. and Mueller, I. (2017) The biology of *Plasmodium vivax*. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 7, a025585. Basu, S., & Sahi, P. K. (2017). Malaria: An Update. Indian Journal of Pediatrics, 84(7), 521–528. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2332-2> Carias, L.L. et al. (2019) Identification and characterization of functional human monoclonal antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy-Binding Protein. J. Immunol. 202, 2648–2660. Cavasini, C. E., Mattos, L. C., Couto, A. A. D., Bonini-Domingos, C. R., Valencia, S. H., Neiras, W. C. de S., Alves, R. T., Rossit, A. R. B., Castilho, L., & Machado, R. L. D. (2007). *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, 101(10), 1042–1044. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.04.011> Corder, R.M. et al. (2019) Statistical modeling of surveillance data to identify correlates of urban malaria risk: A population-based study in the Amazon Basin. PLoS One 14, e0220980. Dayanand, K. K., Achur, R. N., & Gowda, D. C. (2018). Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. Journal of Vector Borne Diseases, 55(1), 1–8. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0972-9062.234620> de Oliveira, T.C. et al. (2020) Population genomics reveals the expansion of highly inbred *Plasmodium vivax* lineages in the main malaria hotspot of Brazil. PLoS Negl. Trop. Dis. 14, e0008808. França, C.T. et al. (2016) *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins are key targets of naturally acquired immunity in young Papua New Guinean children. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, e0005014. Gaedigk, A. et al. (2008) The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. Clin. Pharmacol. Ther. 83, 234–242. Grimberg, B.T. et al. (2007) *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. PLoS Med. 4, e337. Gruszczyk, J. et al. (2016) Structurally conserved erythrocyte-binding domain in *Plasmodium* provides a versatile scaffold for alternate receptor engagement. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 113, E191–200. Gruszczyk, J. et al. (2018a) Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for *Plasmodium vivax*. Science 359, 48–55. Gruszczyk, J. et al. (2018b) Cryo-EM structure of an essential *Plasmodium vivax* invasion complex. Nature 559, 135–139. He, W.Q. et al. (2019) Antibodies to *Plasmodium vivax* reticulocyte binding protein 2b are associated with protection against *P. vivax* malaria in populations living in low malaria transmission regions of Brazil and Thailand. PLoS Negl. Trop. Dis. 13, e0007596. Hietanen, J. et al. (2015) Gene models, expression repertoire, and immune response of *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins. Infect. Immun. 84, 677–685. King, C.L. et al. (2008) Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 8363–8368. Ladeia-Andrade, S. et al. (2019) Monitoring the efficacy of chloroquine-primaquine therapy for uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria in the main transmission hot spot of Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. 63, e01965–18. Lim, C. et al. (2016) Improved light microscopy counting method for accurately counting *Plasmodium* parasitemia and reticulocytosis. Am. J. Hematol. 98, 852–5. Ministério da Saúde do Brasil (2022). Plano Nacional de Eliminação da Malária. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/malaria/elimina-malaria-brasil-plano-nacional-de-eliminacao-da-malaria/view Mueller, I., Galinski, M. R., Baird, J. K., Carlton, J. M., Kochar, D. K., Alonso, P. L., & del Portillo, H. A. (2009). Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. The Lancet Infectious Diseases, 9(9), 555–568. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X) Nicolette, V.C. et al. (2016) Naturally acquired binding-inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein and clinical immunity to malaria in rural Amazonians. J. Infect. Dis. 214, 1539–1546. Rangel, G.W. et al. (2018) Enhanced ex vivo *Plasmodium vivax* intraerythrocytic enrichment and maturation for rapid and sensitive parasite growth assays. Antimicrob. Agents Chemother. 62, e02519–17. Ryan, J. R., Stoute, J. A., Amon, J., Dunton, R. F., Mitalib, R., Koros, J., Owour, B., Luckhart, S., Wirtz, R. A., Barnwell, J. W., & Rosenberg, R. (2006). Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in Western Kenya. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 75(4), 575–581. Urusova, D. et al. (2019) Structural basis for neutralization of *Plasmodium vivax* by naturally acquired human antibodies that target DBP. Nat. Microbiol. 4, 1486–1496. Zimmerman, P.A. et al. (2013) Red blood cell polymorphism and susceptibility to *Plasmodium vivax*. Adv. Parasitol. 81, 27–76.

Upload de Documentos

Arquivo Anexos:

Tipo	Arquivo
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_NSF.pdf
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_Dispensa_TCLE_NSF.pdf
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_NSF.pdf
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Autorizacao_para_uso_material_humano_NSF.pdf
Outros	Autorizacao_biorepositorio_MUF.pdf

Finalizar

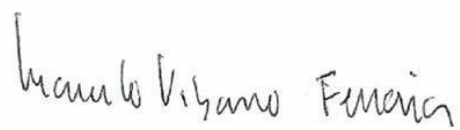
Manter sigilo da íntegra do projeto de pesquisa: Sim

Prazo: Até a publicação dos resultados

Handwritten signature of Luiza Barbosa Barros in cursive script.

São Paulo, 16/10/2023

Data e assinatura da aluna

Handwritten signature of Manoel Viliano Ferreira in cursive script.

São Paulo, 16/10/2023

Data e assinatura do orientador