

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

ALINE MARZANO MIRANDA

**ANTICORPOS CONTRA O PEPTÍDEO SINTÉTICO P314
DERIVADO DA PROTEÍNA 1 DA SUPERFÍCIE DE
MEROZOÍTO DE *Plasmodium vivax* (PvMSP-1) COMO
MARCADORES DE EXPOSIÇÃO**

BELO HORIZONTE – MG
OUTUBRO DE 2022

ALINE MARZANO MIRANDA

**ANTICORPOS CONTRA O PEPTÍDEO SINTÉTICO P314
DERIVADO DA PROTEÍNA 1 DA SUPERFÍCIE DE
MEROZOÍTO DE *Plasmodium vivax* (PvMSP-1) COMO
BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para a obtenção do Título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Érika Martins Braga

BELO HORIZONTE – MG

OUTUBRO DE 2022

043

Miranda, Aline Marzano.

Anticorpos contra o peptídeo sintético p314 derivado da Proteína 1 da Superfície de Merozoíto de Plasmodium vivax (PvMSP-1) como marcadores de exposição [manuscrito] / Aline Marzano Miranda. – 2022.

94 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.a Dr.a Érika Martins Braga.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Plasmodium vivax. 3. Anticorpos. 4. Biomarcadores. 5. Proteína 1 de Superfície de Merozoito. I. Braga, Érika Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DISSERTAÇÃO 444/13/2022

TÍTULO: "ANTICORPOS CONTRA O PEPTÍDEO SINTÉTICO P314 DERIVADO DA PROTEÍNA 1 DA SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTO DE PLASMODIUM VIVAX (PVMSP-1) COMO MARCADORES DE EXPOSIÇÃO"

ALUNA: ALINE MARZANO MIRANDA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMUNOPARASITOLOGIA, BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR DE PARASITOS

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **oito de novembro de 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelas seguintes doutoras:

Mariângela Carneiro

UFMG

Ricardo Wagner de Almeida Vitor

UFMG

Érika Martins Braga- Orientadora

UFMG

Belo Horizonte, 08 de novembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Wagner de Almeida Vitor, Professor do**



Magistério Superior, em 08/11/2022, às 20:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariangela Carneiro, Professora do Magistério Superior**, em 09/11/2022, às 10:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erika Martins Braga, Professora do Magistério Superior**, em 09/11/2022, às 13:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1842442** e o código CRC **08B3BB5A**.

Trabalho realizado no Laboratório de Malária, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Érika Martins Braga. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Projeto (404365/2016-7) e, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (APQ-00361-16); aprovado no Comitê de Ética (CAAE: 01496013.8.0000.5149, parecer 519.481), e contou com a colaboração do Dr. Marcus Vinícius Guimarães Lacerda (Fundação de Medicina Tropical do Amazonas), do Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes (Universidade Federal do Mato Grosso), e do Dr. Dhélio Batista Pereira (Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia). Sisgen: A9C8FAE

Aos meus pais, Maria Auxiliadora e Sérgio Luiz, pelo incentivo, amor, carinho, apoio e
confiança nas minhas escolhas profissionais.

Ao meu amor Thiago Henrique, por todo apoio, carinho, amor e cumplicidade.

Ao meu tio Roberto Dimas (em memória), por todo auxílio, amor e carinho para comigo
ao longo de sua vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me conceder essa oportunidade de desenvolvimento pessoal e profissional, por me fortalecer, guiar os meus caminhos e me dá perseverança para vencer os desafios.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Érika Martins Braga, por todos os ensinamentos, incentivos, orientações e confiança em meu potencial. Agradeço por todos os elogios, puxões de orelha e críticas construtivas. Me encantei com malária durante a sua aula, a partir de então decidi que gostaria de trabalhar com os plasmódios e definitivamente foi a minha melhor decisão, pois fui recebida de braços abertos em seu laboratório e a cada dia que se passa eu desenvolvo mais. Sinto profunda admiração, respeito e imenso carinho por você; lhe considero um exemplo de mulher, de dedicação, força e inspiração para minha jornada.

Aos amigos da turma de mestrado 2021, Ana Carolina, Gabriela, Marcela, João Alessander e Luiz Gustavo pela cooperação, cumplicidade, carinho, amizade e por todos os momentos que passamos e superamos juntos no decorrer das disciplinas.

Aos amigos do Laboratório de Malária- Beatriz, Pedro e de forma muito carinhosa o Luiz Gustavo por todo companheirismo, ajuda, apoio e amizade; pelas contribuições, discussões e todos os desafios vividos; obrigada por serem grandes parceiros nessa jornada. De forma muito especial, agradeço imensamente a Letícia por todo auxílio durante os experimentos, pela eficiência, atenção, cumplicidade, amizade e ao Gustavo pelo acolhimento, pelos ensinamentos, pelas dicas, sugestões, correções e amizade. Agradeço também a Lis, Regiane, Vitor e Vitória, pelas trocas de experiências, momentos compartilhados e discussões no laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia e a todos os professores do departamento que durante as diversas disciplinas, doaram um pouco do seu saber e contribuíram para o meu desenvolvimento e formação.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em parasitologia, Sumara e Sibebe, pelo carinho, atenção, ajuda e serviços prestados.

A professora Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu do laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos pela colaboração na síntese automática do peptídeo.

Ao XXV Seminário Laveran & Deane sobre malária, por todo desenvolvimento e aprendizado. A participação neste evento foi fundamental para realizar uma releitura dos meus dados, aperfeiçoar o projeto e evoluir cientificamente.

Às minhas amigas, quase irmãs, Andressa, Débora, Júlia e Tayná. Obrigada por sempre apoiarem as minhas escolhas, pela cumplicidade, companheirismo, amizade, pela força e por sempre se alegrarem pelas minhas conquistas.

À minha família que tanto amo Pai, Mãe, Tio Beto, Tia Lisa, Tia Lula, Daniel, Juliana, Bia, Tia Claudinha, Ronan, Marina, Nayara, Yameli, Tio Humberto, Tio Cláudio e demais familiares que sempre me incentivaram, me apoiaram a estudar e a alcançar meus objetivos.

Ao meu amor Thiago Henrique por todo carinho, apoio, auxílio, cumplicidade e confiança. Por ser meu ombro amigo em todos os momentos, me passar segurança e me acolher. Obrigada por ser meu ponto de paz nessa vida.

Aos pacientes com malária doadores deste estudo, obrigada pela colaboração e confiança na ciência. Este trabalho é dedicado a vocês e as milhares de pessoas que sofrem e morrem de malária todos os anos no mundo. Espero de alguma forma sempre estar contribuindo para o combate desta doença que há séculos impacta a vida de pessoas.

RESUMO

Plasmodium vivax é o plasmódio humano mais amplamente distribuído no mundo e a espécie mais prevalente no Brasil. Cerca de 99% da transmissão ocorre em áreas endêmicas da Amazônia legal brasileira, mas há também a transmissão em áreas extra-amazônicas sejam de forma autóctone ou importada, mais precisamente em regiões de mata atlântica. Essa espécie apresenta características biológicas que dificultam a interrupção da transmissão: (i) maturação precoce de gametócitos, (ii) presença de hipnozoítos intra-hepáticos e (iii) casos assintomáticos ou oligossintomáticos que mantêm a cadeia de transmissão. Assim, a identificação de proteínas específicas de *P. vivax* e que possam servir como indicadores de exposição ao parasito podem ser úteis para delimitar as áreas de transmissão desta espécie, identificar reservatórios assintomáticos e implementar de forma eficiente, medidas de controle como o diagnóstico e o tratamento específico. A Proteína 1 da Superfície de Merozoíto (MSP-1), destaca-se como um possível alvo pois é essencial para invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, é imunogênica e apresenta porções conservadas e variáveis de acordo com as espécies de plasmódios. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de anticorpos contra um peptídeo derivado da MSP-1 de *P. vivax* pré-selecionado por *spot-synthesis*, p314, como um potencial biomarcador sorológico de malária vivax. Este peptídeo foi produzido sinteticamente na forma solúvel, e foi utilizado em testes de ELISA para mensurar a resposta de anticorpos específicos (IgM, IgG e suas subclasses) em plasmas de pacientes infectados com *P. vivax* (n= 220), pacientes infectados com *P. falciparum* (n= 15) e indivíduos não infectados nunca expostos à malária (n= 48). Os resultados demonstram que os níveis de IgG anti-p314 foram significativamente maiores em pacientes infectados com *P. vivax* em comparação aos infectados com *P. falciparum* (p=0,0001). Para avaliação da cinética da resposta de IgM, IgG total e subclasses, plasmas de 13 pacientes, obtidos no dia do diagnóstico de malária pela gota espessa (DO) e 63 dias após o tratamento específico para *P. vivax*, foram utilizados. Não foram verificadas diferenças significativas entre os níveis de IgM e IgG em relação aos dias 0 e 63. Dentre as subclasses, IgG1 se destacou como biomarcador de exposição, uma vez que seus níveis foram significativamente maiores em plasmas de pacientes infectados por *P. vivax* e IgG3 apresentou queda significativa de níveis após dois meses do diagnóstico e cura da infecção. Esses dados são promissores e sugerem que a subclasse IgG1 anti-p314 é um alvo marcador de exposição por *P. vivax*, logo, pode ser um potencial biomarcador a ser implementado em estudos epidemiológicos que visem a delimitação de áreas de transmissão. Além disso, a avaliação de IgG1 anti-p314 associado à IgG3 poderá ser utilizada para estimar surtos de *P. vivax* e exposições recentes ao parasito.

Palavras-chave: *Plasmodium vivax*; MSP-1; anticorpos; biomarcador; exposição.

ABSTRACT

Plasmodium vivax is the most widely distributed human plasmodium in the world and the most prevalent species in Brazil. About 99% of transmission occurs in endemic areas of the Brazilian legal Amazon, but there is also transmission in extra-Amazonian areas, whether autochthonous or imported, more precisely in Atlantic Forest regions. Biological characteristics of this species make it difficult to interrupt transmission: (i) early maturation of gametocytes, (ii) presence of intrahepatic hypnozoites, and (iii) asymptomatic or oligosymptomatic cases that maintain the transmission chain. Thus, the identification of specific *P. vivax* proteins that can serve as indicators of exposure to the parasite can be useful to delimit the transmission areas of this species, identify asymptomatic reservoirs and efficiently implement control measures such as diagnosis and treatment. Merozoite Surface Protein 1 (MSP-1) stands out as a possible target because it is essential for erythrocyte invasion by merozoites and has conserved and variable portions according to plasmodium species. Thus, the objective of this work was to evaluate the potential of antibodies against a peptide derived from *P. vivax* MSP-1 pre-selected by spot-synthesis, p314, as a potential serological biomarker of *vivax* malaria. This peptide was synthetically produced in soluble form and was used in ELISA tests to measure the response of specific antibodies (IgM, IgG and their subclasses) in plasma from infected patients with *P. vivax* (n= 220), infected patients with *P. falciparum* (n=15) and uninfected individuals never exposed to malaria (n=48). The results show that anti-p314 IgG levels were significantly higher in patients infected with *P. vivax* compared to those infected with *P. falciparum* (p=0.0001). To evaluate the kinetics of the IgM response, total IgG and subclasses, plasmas from 13 patients, obtained on the day of thick smear malaria diagnosis (D0) and 63 days after specific treatment for *P. vivax*, were used. There were no significant differences between the levels of IgM and IgG in relation to days 0 and 63. Among the subclasses, IgG1 stood out as a biomarker of exposure, since its levels were significantly higher in plasma from patients infected with *P. vivax* and IgG3 showed a significant drop in levels two months after the diagnosis of infection. These data are promising and suggest that the IgG1 anti-p314 subclass is a target marker of exposure by *P. vivax*, therefore, it may be a potential biomarker to be implemented in epidemiological studies aimed at delimiting areas of transmission. In addition, the evaluation of IgG1 anti-p314 associated with IgG3 could be used to estimate *P. vivax* outbreaks and recent exposures to this parasite.

Keywords: *Plasmodium vivax*; MSP-1; antibodies; biomarker; exposure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Países endêmicos para malária seu <i>status</i> no ano de 2020.....	15
Figura 2: Comparação do progresso na incidência de casos de malária.....	16
Figura 3: Mapa de risco de transmissão da malária, por município, no Brasil, em 2020.....	20
Figura 4: Ciclo biológico do <i>Plasmodium vivax</i>	26
Figura 5: Municípios da região extra-amazônica que notificaram mais casos importados ou autóctones.....	33
Figura 6: Processamento MSP-1.....	35
Figura 7: Área de estudo, região Amazônica Brasileira.....	40
Figura 8: Predição, <i>in silico</i> , de epítomos lineares de células B na proteína PvMSP-1, cepa Sal I.....	49
Figura 9: Níveis de IgM e IgG contra o p314.....	50
Figura 10: Níveis de IgG contra o p314.....	50
Figura 11: Níveis de IgM e IgG contra o peptídeo 314 em amostras de pacientes com acompanhamento do tratamento.....	52
Figura 12: Associação entre parâmetros clínicos e níveis de anticorpos contra p314...52	52
Figura 13: Níveis de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra o peptídeo 314.....	54
Figura 14: Níveis de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra o peptídeo 314 em amostras pareadas de pacientes de acompanhamento.....	55
Figura 15: Níveis de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra o peptídeo 314 em amostras não pareadas de pacientes de acompanhamento.....	56
Figura 16: Curva ROC da resposta de IgG, IgG1 e IgG3 contra o peptídeo 314 da PvMSP-1.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos autóctones de malária de acordo com a área especial de infecção.....	32
Tabela 2 - Manifestações clínicas relatadas pelos pacientes com malária durante a avaliação médica.....	41
Tabela 3 - Sequência de aminoácidos do peptídeo 314 derivado da PvMSP-1.....	43
Tabela 4 - Detalhamento dos aminoácidos utilizados na síntese do peptídeo 314.....	44
Tabela 5 - Caracterização da população de estudo.....	46
Tabela 6 - Alinhamento do p314 no BLAST.....	47
Tabela 7 - Similaridade da sequência de p314 com Gênero <i>Plasmodium</i>	48
Tabela 8 – Valores de mediana e percentil 25%-75% para cada subclasse.....	54
Tabela 9 – Valores obtidos para cada subclasse.....	57
Tabela 10 - Detalhamento dos valores obtidos na curva ROC.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AMA-1	– Antígeno 1 de Membrana Apical (<i>Apical Membrane Antigen 1</i>)
BSA	– Albumina de Soro Bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CA	– Califórnia
BLAST	_ <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAAE	– Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CNPq	– Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CSP	– Proteína Circum-esporozoíta (<i>Circumsporozoite Protein</i>)
DBP	– <i>Duffy Binding Protein</i>
EGF	– Fator de Crescimento Epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
ELISA	– <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	– Estados Unidos da América
FAPEMIG	– Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
Fc	_ Fragmento cristalizável
Fmoc	– 9-Fluorenil Metil Oxicarbonila
GPI	– Glicosilfosfatidilinositol
GTS-	<i>Global technical strategy for malaria for 2016-2030</i>
HIV	– Vírus da Imunodeficiência Humana
HSPG	– Proteoglicanos de Heparan Sulfato (<i>Heparan Sulfate Proteoglycan</i>)
IC	_ Intervalo de confiança
ICB	– Instituto de Ciências Biológicas
IgA	_ Imunoglobulina A
IgD	_ Imunoglobulina D
IgE	_ Imunoglobulina E
IgG	– Imunoglobulina G
IgG1	_ Imunoglobulina G tipo 1
IgG2	_ Imunoglobulina G tipo 2
IgG3	_ Imunoglobulina G tipo 3
IgG4	_ Imunoglobulina G tipo 4
IgM	_ Imunoglobulina M
IPA	– Incidência Parasitária Anual
IR	– Índice de Reatividade

MALDI	– Ionização e Dessorção à Laser Assistida por Matriz (<i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization</i>)
MG	– Minas Gerais
MSP	– Proteína de Superfície de Merozoíto (<i>Merozoite Surface Protein</i>)
OD	– Densidade Ótica
OMS	– Organização Mundial da Saúde
OPD	– <i>O-Phenylenediamine Dihydrochloride Substrate</i>
PBS	– Tampão Fosfato-Salino
PBST	– Tampão Fosfato-Salino com Tween 20
PCR	_ Reação em cadeia da polimerase
PepCalc	_ <i>Peptide property calculator</i>
PvMSP-1	– Proteína 1 de superfície de Merozoíto de <i>Plasmodium vivax</i>
PfMP1	_ Proteína 1 Majoritária na Membrana de Eritrócitos
RNA	– Ácido Ribonucleico
ROC	– Característica de Operação do Receptor
RON	– <i>Rhoptry Neck Protein</i>
rRNA	– RNA ribossomal
Sal I	– Salvador I
SIVEP	– Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica
SSU	– <i>Small Subunit</i>
SVS	– Secretária de Vigilância à Saúde
TFA	– Ácido Trifluoracético
TRAP	– Proteína Relacionado à Trombosporidina (<i>Thrombosporidin-Related Adhesive Protein</i>)
UFMG	– Universidade Federal de Minas Gerais
UFMT	– Universidade Federal do Mato Grosso
WHO	– <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Malária.....	14
1.2. Malária no Brasil.....	20
1.3. Ciclo de <i>Plasmodium</i> spp. no hospedeiro vertebrado.....	22
1.4. Resposta humoral adquirida durante a malária.....	27
1.5. O uso de anticorpos em estudos epidemiológicos.....	30
1.6. Proteína 1 da superfície de merozoíto (MSP-1).....	34
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo geral.....	39
3.2. Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1. Obtenção das amostras.....	40
4.2. Síntese de peptídeos em membrana de celulose- <i>SPOT synthesis</i>	42
4.3. Síntese química de peptídeos solúveis.....	43
4.4. Ensaio imunoenzimático.....	44
4.5. Análises estatísticas.....	45
5. RESULTADOS.....	46
5.1. Análise dos parâmetros clínicos, epidemiológicos e demográficos.....	46
5.2. BLAST (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>) do peptídeo 314.....	47
5.3. Predição in silico de epítomos de células B da PvMSP-1 e do p314.....	48
5.4. Detecção de anticorpos IgM e IgG anti-p314.....	49
5.5. Avaliação de anticorpos IgM e IgG anti-p314 em amostras de acompanhamento.....	51
5.6. Correlação da parasitemia com os níveis de anticorpos.....	52
5.7. Subclasses de IgG anti-p314 como biomarcadores de exposição.....	53
5.8. Subclasses anti-p314 em amostras de acompanhamento.....	54
5.9. Análise da Curva ROC para IgG, IgG1 e IgG3 anti-p314.....	57
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÕES.....	66
8. REFERÊNCIAS.....	67
9. ANEXO.....	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Malária

A malária é uma doença provocada por protozoários parasitos do Filo Apicomplexa, família Plasmodidae e gênero *Plasmodium*. Diversas espécies de plasmódios acometem vertebrados, no entanto, as que parasitam exclusivamente os seres humanos são as espécies: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* (SALLARES et al., 2004; SUTHERLAND et al., 2010; WHO, 2021). O *Plasmodium knowlesi* infecta naturalmente primatas no sudeste asiático, contudo, passou a apresentar caráter zoonótico, uma vez que tem sido reportado como mais uma espécie causadora de malária humana (WHITE, 2008; COX-SINGH et al., 2008; SINGH & DANESHVAR, 2013; MILLAR SB & COX-SINGH, 2015).

A malária acompanha o ser humano desde os primórdios das civilizações e até os dias atuais é considerada uma das doenças infecciosas de maior impacto em termos de morbidade e mortalidade (RETIEF & CILLIRES, 2006; VARO et al., 2020, WHO, 2021; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Registros do parasito recuperados por sondas moleculares em material ósseo e em múmias datadas de mais de 2000 a.C. revelam que a parasitose provavelmente acometeu as civilizações chinesa, egípcia, grega e europeia (SALLARES et al., 2004; RETIEF & CILLIRES, 2006). Por milhares de anos acreditou-se que a febre malárica era ocasionada por vapores ou odores fétidos que emanavam de lagos e pântanos, sendo desvendada a real importância dos anofelinos na transmissão do parasito somente a partir do século XX (COX, 2010; LOY et al., 2017).

A transmissão de *Plasmodium* spp. para o ser humano se dá através da picada de insetos fêmeas infectadas da ordem Diptera, família Culicidae e gênero Anopheles (SINKA et al., 2012). Cerca de 70 espécies de anofelinos são consideradas potenciais vetores desses parasitos no mundo, dentre elas, as de maior importância que ocorrem nas Américas são: *Anopheles darlingi* que recentemente foi renomeado como *Nyssorhynchus darlingi*, *An. albitarsis*, *An. aquasalis* e *An. pseudopunctipennis*. No continente africano, os vetores de malária fazem parte do complexo de espécies *An. gambiae* e na Ásia os insetos de importância entomológica fazem parte do complexo de espécies *An. culicifacies* (SINKA et al., 2012; MASSEY et al., 2016).

A malária é considerada um grave problema de saúde pública em países tropicais e subtropicais do globo (WHO, 2021) (**Figura 1**), endêmica em mais de 85 países, está intimamente atrelada às precárias condições de vida (GREENWOOD et al., 2008; JUNIOR et al., 2014; VARO et al., 2020). A ocorrência da infecção se dá principalmente em países subdesenvolvidos, que apresentam temperatura constantemente elevada, alta umidade e precipitação adequada para o desenvolvimento do inseto vetor (GREENWOOD et al., 2008; WHO, 2018; WHO, 2021). Essas condições ambientais associadas com o baixo desenvolvimento econômico, ineficácia em políticas públicas, instabilidade social, bem como escassez de recursos para o diagnóstico e tratamento, contribuem para o aumento do número de casos. (WHITE et al., 2013; PHILLIPS et al., 2017; ASHLEY et al., 2018).

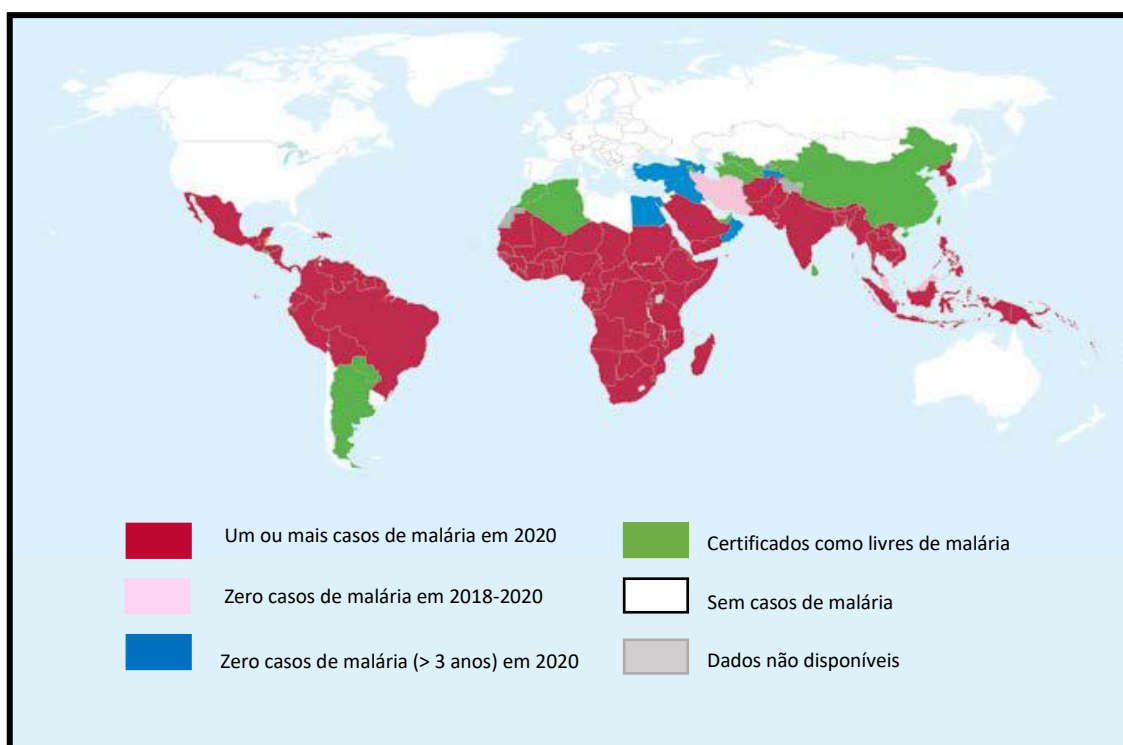


Figura 1: Países endêmicos para a malária e seu status no ano de 2020.
(Adaptado de WHO, *World Malaria Report 2021*).

Cerca de 3 bilhões de pessoas residem em áreas de risco para malária, o que equivale à quase metade da população mundial (WHO, 2018). A maioria dos casos e óbitos ocorrem no continente africano (95%) e grande porcentagem das mortes (80%) são de crianças abaixo de cinco anos de idade (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2003; WHO, 2018; WHO, 2021). A região do sudeste asiático apresenta nove países endêmicos para malária e em 2020, cinco milhões de casos foram registrados, o que corrobora com

2% de toda a carga global de malária. Cerca de 77% dos casos que ocorrem nas Américas se concentram na Venezuela, Brasil e Colômbia e a maioria das notificações (68%) foram ocasionados por *P. vivax* em 2020 (WHO, 2021).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2015 implementou um plano global denominado *Global technical strategy for malaria for 2016-2030* (GTS), que tem por objetivo reduzir a incidência e a mortalidade por malária no mundo em 90% até 2030 (WHO, 2021). A taxa de incidência global (o número de casos por 1000 habitantes) de malária reduziu entre 2010 e 2018 com queda de 71 para 57, respectivamente (WHO, 2019). Nas Américas entre os anos de 2000 e 2020 a incidência de malária que era de 1.5 milhões de casos passou para 0.65 milhões com redução em 58%. No mesmo intervalo de tempo, os óbitos também demonstraram uma queda de 56% (de 909 para 409) (WHO, 2021). Logo, é perceptível que nos últimos anos houve significativa redução do número de casos e óbitos por malária, comprovando que a vigilância epidemiológica, o diagnóstico e o tratamento específico para cada espécie de *Plasmodium* funciona e não podem ser negligenciados (**Figura 2**). Entretanto, quaisquer desestruturas nos pilares de controle podem impor um rápido aumento nos índices da doença (GREENWOOD, 2008b; WHO, 2019).

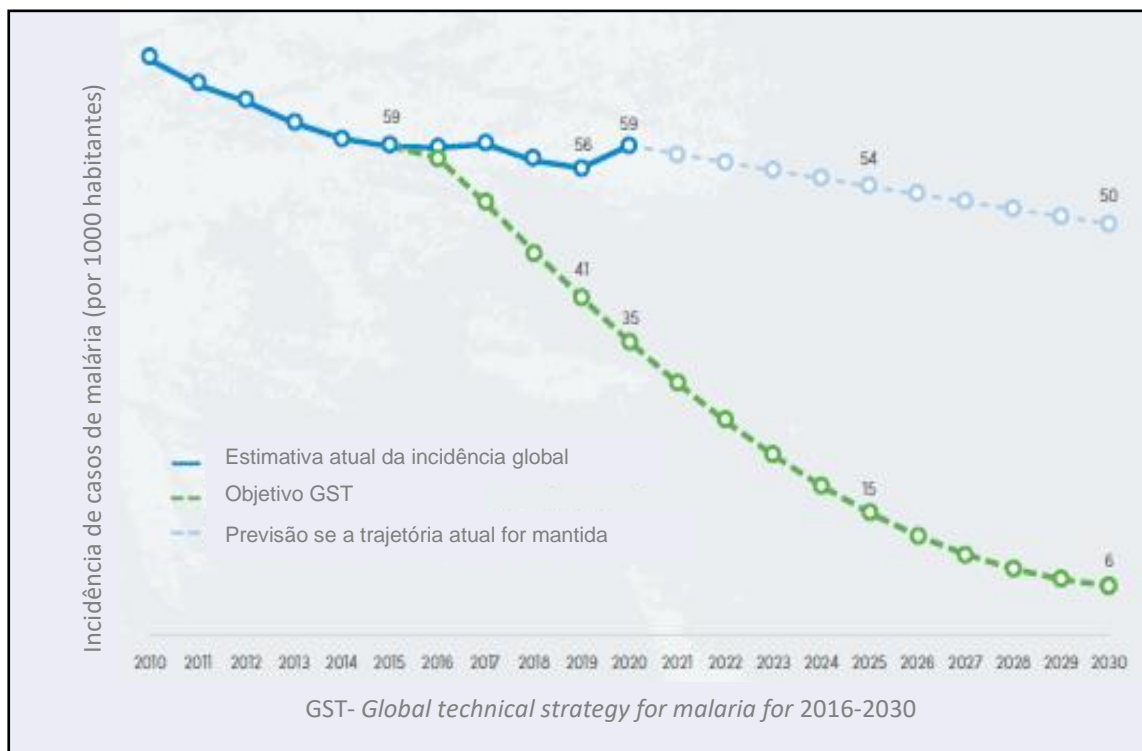


Figura 2. Comparação do progresso na incidência de casos de malária considerando dois cenários: manutenção da trajetória atual (azul), metas GTS alcançadas (verde). (Adaptado de WHO, *World Malaria Report 2020*).

No ano de 2019, a OMS registrou 405 mil mortes provocadas por malária e 227 milhões de casos (WHO, 2021). Em 2020, um ano após o início da pandemia de COVID-19, houve 241 milhões de casos de malária no mundo, um aumento de 14 milhões se comparado com 2019 (WHO, 2021). Além disso em âmbitos globais, no ano de 2020 foram registradas 627 mil mortes por malária no mundo, com um aumento de 12% em relação ao ano anterior. Esses dados retratam os impactos que a pandemia de COVID-19 ocasionou no controle e eliminação da malária (ROGERSON et al., 2020; WHO, 2021). Até o momento, na maioria dos países africanos endêmicos, menos de 11% da população foi totalmente vacinada contra o SARS COV-2 (WHO, 2021). Nos últimos dois anos pandêmicos, houve interrupções contínuas dos serviços essenciais de saúde, devido as ondas de transmissão viral, bem como uma pressão crescente sob as economias desses países (WHO, 2021). Esses dados evidenciam como a incidência de malária no mundo é diretamente afetada pela desestruturação política, social e sanitária e ainda, como será complexo e desafiador alcançar o êxito de sua eliminação.

Dentre as espécies de *Plasmodium* que infectam o homem, o *P. falciparum* é considerada a espécie mais patogênica, já que facilmente pode ocasionar formas graves da doença, levando com maior frequência os indivíduos a óbito (HALDAR et al., 2007; MILLER et al., 2013; MOXON et al., 2020). Isso provavelmente está associado a infecções com maior parasitemia (parasitos/ μ L de sangue), uma vez que o *P. falciparum* é capaz de infectar eritrócitos jovens e maduros. Além disso, a exposição de uma família de proteínas altamente polimórficas denominada PfEMP1 (Proteína 1 Majoritária na Membrana de Eritrócitos), na membrana dos eritrócitos infectados, contribui para a patogenicidade desta espécie (FAIRHURST & WELLEMS, 2006; KRAEMER AND SMITH, 2006, VARO et al., 2020). Os eritrócitos infectados com formas maduras (trofozoítos e esquizontes) de *P. falciparum*, apresentam em sua superfície variantes da PfEMP1. Ao percorrer os capilares sanguíneos mais profundos, estes eritrócitos apresentando essas proteínas variantes, interagem com moléculas de adesão presentes no endotélio, o que provoca o fenômeno de cito aderência ao epitélio vascular causando micro trombos, interrupção do fluxo sanguíneo, hipóxia e complicações graves em vários órgãos (FAIRHURST & WELLEMS, 2006; KRAEMER & SMITH, 2006; SMITH et al.,

2013; MOXON et al., 2020). Ainda, é uma espécie de maior prevalência em países africanos, e ao longo dos anos são cada vez mais comuns o registro de cepas resistentes aos antimaláricos utilizados para o tratamento da malária falciparum (MILLER et al., 2013; FANÇONY & BRITO, 2016; SIDDIQUI et al., 2021).

Já *P. vivax*, é a espécie mais distribuída pelo mundo sendo responsável por mais da metade do número de casos registrados fora da África (ADAMS & MUELLER, 2017; WHO, 2021). É uma espécie que geralmente causa a malária não complicada, podendo, contudo, causar sintomas graves como a anemia e desconforto respiratório (COSTA et al., 2012; CASTRO-GOMES et al., 2014; COSTA et al., 2020). *P. vivax* tem como característica infectar somente reticulócitos (hemácias jovens), que representam em média 1-2% das células sanguíneas, desse modo, a parasitemia em casos de malária vivax é significativamente mais baixa (MORENO-PERÉZ & PATARROYO, 2013; ZIMMERMAN et al., 2013). Recentemente tem sido demonstrado que durante o desenvolvimento de *P. vivax* no hospedeiro vertebrado, uma biomassa considerável de parasitos é mantida em nichos eritroblásticos localizados na medula óssea e no baço que são ricos em reticulócitos jovens (BARBER et al., 2015; SILVA-FILHO et al., 2020; KHO et al., 2021) o que pode ter relação direta com a baixa parasitemia causada por esta espécie. Embora alguns estudos demonstrem a possibilidade de adesão do parasito associado a casos graves de malária vivax (COSTA et al., 2011; COSTA et al., 2012), esta espécie não ocasiona o fenômeno de cito aderência semelhante com o que ocorre em casos de *P. falciparum*. Por sua vez, apresenta um estágio dormente, os chamados hipnozoítos, que dificultam a cura parasitológica e são responsáveis por recaídas tardias da doença (MARKUS, 2015; ADAMS & MUELLER, 2017).

Indivíduos que são acometidos com vários episódios de malária, podem adquirir um estado de imunidade parcial, no qual apresentam uma baixa carga parasitária com poucos ou nenhum sintoma da doença (WHITE et al., 2013; PHILLIPS et al., 2017; ASHLEY et al., 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022) mas, podem servir como fonte de infecção aos mosquitos. A infecção frequentemente acomete com maior gravidade a população de gestantes e crianças abaixo dos cinco anos de idade e isso se dá tanto pelo atraso no diagnóstico e administração do tratamento, como também por haver uma queda da imunidade no período gestacional ou, no caso das crianças, por não ter desenvolvido mecanismos imunológicos que inibam parte da replicação do parasito (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2003).

Os sinais e sintomas da malária são dependentes de fatores inerentes a espécie de *Plasmodium* infectante, do status imunológico do hospedeiro e da presença ou ausência de resistência natural a infecção (WHITE et al., 2013; PHILLIPS et al., 2017). Na malária não complicada, há a ocorrência de febre intermitente, calafrios, tremedeira, sudorese intensa, cefaleia, fadiga, mialgias, desconforto abdominal, náusea, vômito, anemia moderada e ligeira hepatoesplenomegalia. A gravidade na malária pode ser descrita com anemia grave, hipoglicemia, edema pulmonar, disfunção renal, icterícia, malária cerebral e acidose metabólica (WHITE et al., 2013; CASTRO-GOMES et al., 2014; COWMAN et al., 2016; MILNER, 2018).

Tendo em vista que a maioria dos casos de malária são de origem antroponótica e sendo assim, os componentes que mantêm o ciclo de transmissão são apenas o ser humano e o mosquito vetor, a prevenção da infecção torna-se pautada no diagnóstico preciso e tratamento precoce dos indivíduos infectados (DA SILVA-NUNES et al., 2008; MEIBALAN et al., 2017). Cabe ressaltar que quando realizado de forma correta e em tempo oportuno, o tratamento garante a cura da doença (CARLTON et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Nesse aspecto, uma vez que há a diminuição dos reservatórios humanos, conseqüentemente ocorrerá a interrupção da transmissão com redução da incidência e prevalência da doença (MEIBALAN et al., 2017; RECHT et al., 2017).

Os tratamentos disponíveis para malária atualmente, tem por objetivo atingir o parasito em pontos estratégicos do seu desenvolvimento no hospedeiro vertebrado. É realizado com o uso de fármacos derivados da artemisinina (ACT), artemeter + lumefantrina ou artesunato + mefloquina, cloroquina e primaquina ou tafenoquina (PHILLIPS et al., 2017; LEWES et al., 2019). Para adotar a terapêutica mais adequada, é imprescindível considerar a espécie infectante, idade, peso, possibilidade de gestação e quaisquer outras condições associadas ao hospedeiro humano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Para otimizar e aperfeiçoar o trabalho dos profissionais de saúde, há disponível um Guia de Tratamento da Malária no Brasil, que contém todas as orientações preconizadas e estabelecidas pela OMS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

1.2. Malária no Brasil

A malária é endêmica na região da Amazônia Legal, que abrange nove estados brasileiros: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (MINISTERIO DA SAÚDE, 2022) (**Figura 3**). Esforços foram iniciados a partir dos anos 50 para o combate à doença, e apesar de contribuir para redução das áreas endêmicas no país, as tentativas de controle acarretaram certos impactos e nem sempre foram tão eficientes. O uso maciço de inseticidas (DDT) para eliminar o mosquito junto a profilaxia antimalárica baseada na adição de cloroquina no sal de cozinha, ocasionaram prejuízos ambientais, toxicidade e sobretudo o surgimento de cepas resistentes de *Plasmodium* spp. e de anofelinos aos componentes utilizados (GRIFFING et al., 2015; BAIA-DA-SILVA et al., 2019).

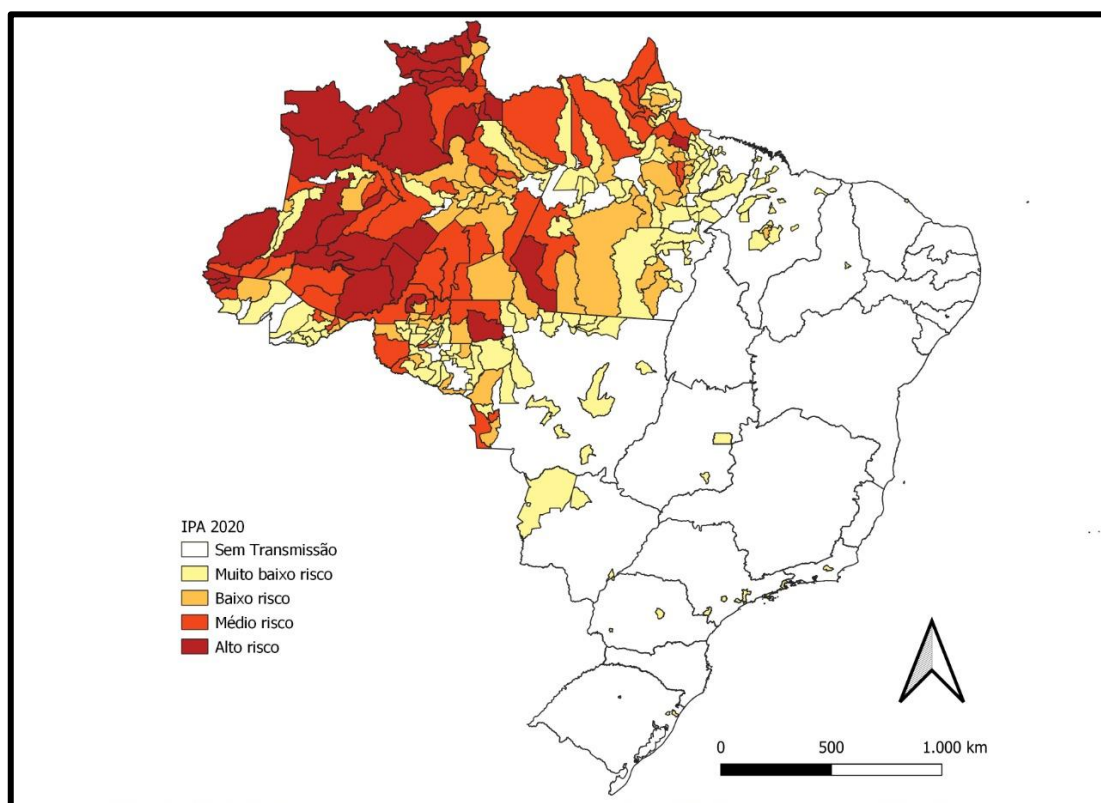


Figura 3: Mapa de risco de transmissão da malária, por município, no Brasil, em 2020. O risco é estimado a partir da IPA = Incidência Parasitária Anual (número de diagnósticos positivos para malária por 1000 habitantes, em uma determinada área, no período de um ano). O risco é dividido entre baixo (IPA < 10 casos/mil habitantes), médio (IPA entre 10 a 49 casos/mil habitantes) e alto (IPA ≥ 50 casos/mil habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021 – Sinan/SVS/MS e Sivep – Malária/SVS/MS).

Segundo o Ministério da saúde, em 2019 foram notificados 154.453 casos de malária no país, com redução de 19% em relação ao ano de 2018. O registro de casos

graves também apresentou uma redução no país com apenas 37 óbitos por malária em 2019. Ainda em 2019, 80% dos casos ocorreram em áreas rurais ou indígenas e 11% dos casos ocorreram em áreas de garimpo ou assentamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Em 2020, foram cerca de 143.395 casos autóctones no país, uma redução de 6,5% em comparação ao ano anterior e em 2021 foram registrados 137.857 casos autóctones, representando uma redução de quase 4%. Do total de casos autóctones registrados no país em 2021, 17% foram de malária por *P. falciparum* e malária mista, sendo os outros 83% de malária por *P. vivax* e outras espécies (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Na região da Amazônia Legal ocorre 99 % dos casos de malária registrados no país, isso se deve ao fato da região apresentar condições ambientais que favorecem o desenvolvimento da principal espécie de mosquito transmissora de malária no Brasil, o *Nyssorhynchus darlingi* (GIL et al., 2007; DA SILVA-NUNAS et al., 2008; DA SILVA-NUNES et al., 2012). Embora, a grande proporção de infecções esteja concentrada na região amazônica, também ocorrem registros da doença na região extra-amazônica (DE PINA-COSTA et al., 2018; GARCIA et al., 2022). Essas notificações necessitam de maior atenção, uma vez que, a letalidade da malária na área endêmica é considerada baixa, entretanto, o oposto é verificado no restante do país, no qual a letalidade pode chegar a ser 100 vezes maior (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Na área extra-amazônica, onde a ocorrência da doença não é usual, os sintomas são vistos como inespecíficos e frequentemente confundidos com arboviroses ou outras infecções (DE PINA-COSTA et al., 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Desse modo, a desinformação, o atraso no diagnóstico e a morosidade para o início do tratamento, prejudica o prognóstico e aumenta a letalidade da doença (DA SILVA-NUNAS et al., 2008; DA SILVA-NUNES et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Recentemente foram verificados mosquitos na região de mata atlântica infectados com espécies de *Plasmodium* humano, fato que sugere a ocorrência de transmissão autóctone nesta região, uma cadeia de transmissão que pode contar com a participação de *An. (Kerteszia) cruzii*, primatas não humanos e humanos (DEMARI-SILVA et al., 2020; DE LEMOS et al., 2021; DUARTE et al., 2021). Além disso, o *Plasmodium simium* que infecta naturalmente primatas não humanos, foi identificado em humanos pela primeira vez no ano de 2017. Desde então tem sido admitida a possibilidade de transmissão zoonótica de malária na região de mata atlântica (BRASIL et al., 2017) fato que aponta para novos desafios para o controle da doença.

A espécie de *Plasmodium* mais prevalente no Brasil é o *P. vivax*, sendo responsável por cerca de 85% dos casos; *P. falciparum* compreende cerca de 15% dos relatos e *P. malariae* menos de 1% (RECHT et al., 2017; WHO, 2021). É importante ressaltar, que para as diferentes espécies de *Plasmodium* que ocorrem no Brasil, há uma intervenção terapêutica adequada que atende às particularidades de cada caso e elimina completamente o parasito. Enquanto para *P. falciparum* a cloroquina não é mais indicada devido à resistência, para *P. vivax*, a cloroquina combinada com a primaquina se mantém como a primeira linha de escolha. Atualmente as infecções por *P. falciparum* são tratadas no país com uma combinação de fármacos derivados da artemisinina (PLEWES et al., 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Sendo assim, torna-se evidente a importância do diagnóstico diferencial para cada espécie de parasito.

1.3. Ciclo de *Plasmodium spp.* no hospedeiro vertebrado

Plasmodium spp. apresenta um ciclo biológico complexo que inclui o homem como hospedeiro intermediário e os mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* como hospedeiros definitivos do parasito (**Figura 4**). O ciclo se dá a partir da picada infectante dos anofelinos, no qual são inoculados na derme dos hospedeiros vertebrados, os esporozoítos. Estes apresentam a locomoção típica do filo Apicomplexa denominada *gliding* que os permite ter movimentos rápidos e auxilia na mecânica de invasão celular (MERNARD et al., 2013; COWMAN et al., 2016). Um estudo utilizando imagem intravital da pele de camundongos infectados com *P. berghei* confirma a presença de esporozoítos que exibem motilidade acelerada na derme o que se relaciona com o fato deles deixarem o local da picada rapidamente. Neste trabalho, aproximadamente 70% dos esporozoítos foram encontrados na corrente sanguínea e 30% na via linfática (AMINO et al., 2006). Os esporozoítos que desembocam nos vasos linfáticos terão um percurso limitado, pois são drenados para os linfonodos mais próximos, fagocitados por células apresentadoras de antígenos e apresentados aos linfócitos TCD4+ (AMINO et al., 2006; COWMAN et al., 2016). Em contrapartida, os esporozoítos que seguem a via hematogênica poderão alcançar a barreira sinusoidal do fígado que é formada por células endoteliais e células de Kupffer (TAVARES et al., 2013).

Diversos estímulos moleculares estão envolvidos no processo de infecção da célula hospedeira, acredita-se que os esporozoítos migram para os hepatócitos atraídos

pela elevada quantidade de proteoglicanos de heparan-sulfato (*Heparan Sulfate Proteoglycans*- HPSGs) presentes nesse tipo celular (PRUDENCIO et al., 2006; EJIGIRI & SINNIS, 2009; HERRERA et al., 2015). Pode-se destacar que durante o percurso do parasito há o processo de transmigração celular, que parece ser um evento de importância para o sucesso e estabelecimento da infecção, uma vez que induz a produção de fator de crescimento dos hepatócitos, o que colabora para que tais células sejam mais susceptíveis (CARROLO et al., 2003). A proteína SPECT de micronema, parece assumir função essencial para que o esporozoítio possa transpor as barreiras celulares, formando vacúolos transitórios (não dependentes da formação de junção móvel), até alcançar as células alvos, os hepatócitos (ISHINO et al., 2004; YUDA & ISHINO, 2004; ISHINO et al., 2005; RISCO-CASTILLO et al., 2015). A proteína circumesporozoítio (*Circumsporozoite Protein*- CSP), abundante na superfície do esporozoítio, pode interagir com os HPSGs presentes nos hepatócitos e contribuir para a internalização do parasito (PRUDENCIO et al., 2006; EJIGIRI & SINNIS, 2009). Além disso, a proteína TRAP (*Thrombosporidin-Related Adhesive Protein*) e o antígeno 1 de membrana apical (*Apical Membrane Antigen-1* – AMA-1) são secretados pelas organelas do complexo apical e expressos na superfície do parasito juntamente com outras moléculas durante o processo de invasão. Por contribuir para a interação do parasito com a célula hospedeira, essas proteínas constituem uma maquinaria molecular essencial para o estabelecimento intracelular (BESTEIRO et al., 2011; SINNIS & ZAVALA, 2012).

Após a chegada aos hepatócitos os esporozoítos podem transmigrar através destas células ou induzir a formação de um vacúolo parasitóforo (KAPPE et al., 2004). O processo de invasão celular inicia-se com a aderência frouxa do parasito, permitindo que o mesmo seja capaz de movimentar na superfície da célula até encontrar um sítio susceptível para a entrada. Na sequência, o parasito estabelece uma forte ligação com a membrana da célula hospedeira, reorienta o complexo apical que passa a ter contato direto com a célula. Uma vez associados, inicia-se a secreção dos conteúdos proteico-enzimáticos presentes nas organelas do complexo apical, dando origem a junção móvel, responsável por estabelecer uma conexão firme entre o parasito e a membrana da célula hospedeira (BESTEIRO et al., 2011; BARGIERI et al., 2014; HORTA et al., 2020). A junção móvel corresponde a um complexo de proteínas que se depositam na membrana da célula e na membrana do parasito, permitindo que o parasito consiga transpor a barreira celular impulsionado por um motor de actina-miosina. Com a interação entre a

movimentação do tipo *gliding* e a formação da junção móvel, o parasito consegue ser pressionado para dentro do hepatócito. No processo de entrada, ocorre a invaginação da membrana plasmática da célula hospedeira, o esporozoíto sofre uma constrição celular devido à pressão exercida pela junção móvel e ao fim se estabelece dentro do vacúolo parasitóforo (MOTA et al., 2001; BESTEIRO et al., 2011; BARGIERI et al., 2014; HORTA et al., 2020).

Uma vez estabelecida a infecção, dentro do vacúolo parasitóforo, o esporozoíto passa de uma forma afilada e delgada para uma forma esférica e aumentada, denominada trofozoíto pré-eritrocítico. O processo de mudança morfofuncional pode levar aproximadamente de dois a dez dias (MERNARD et al., 2013; COWMAN et al., 2016). Assim, torna-se possível o desenvolvimento do parasito que divide mitoticamente por esquizogonia, dando origem a merozoítos teciduais, os quais podem chegar até 40.000 por hepatócito infectado (STURM et al., 2006). Tais merozoítos são liberados nos sinusóides hepáticos por meio de vesículas denominadas merossomos, posteriormente, alcançam a próxima célula-alvo presente na corrente sanguínea, os eritrócitos (STURM et al., 2006; MENARD et al., 2013). Os merossomos formados permitem que os merozoítos abandonem o tecido hepático, sem serem reconhecidos pelo sistema de defesa do hospedeiro, isso porque eles são constituídos pela membrana celular dos hepatócitos (STURM et al., 2006). A formação dessas vesículas consiste em uma estratégia de subversão da célula hospedeira a favor do parasito, pois permite o egresso silencioso do tecido hepático. *Plasmodium* é capaz de alterar as funções celulares e promover a ativação de caspases fazendo com que a célula entre em processo apoptótico, contudo ao consumir o cálcio (Ca^{2+}) intracelular, o parasito permite com que a célula mantenha a integridade da membrana plasmática, uma vez que na ausência do cálcio, a inversão de resíduos de fosfatidilserina são impedidos e dessa forma, a célula não é reconhecida como “morta” pelo sistema imunológico (STURM et al., 2006; BAER et al., 2007; GRAEWE et al., 2012).

Dentre as espécies de *Plasmodium spp.* que infectam o ser humano, *P. vivax* e *P. ovale* apresentam uma particularidade na fase exo-eritrocítica, já que possuem a habilidade em gerar formas dormentes, hipnozoítos, as quais permanecem no tecido hepático após o tratamento da infecção original (ADAMS & MUELLER, 2017; MERRICK, 2021) (**Figura 4**). Os hipnozoítos podem persistir no hepatócito por meses

ou anos antes de iniciar uma infecção sanguínea, atuando como reservatório do parasito. Portanto, essas formas latentes podem ser responsáveis por recaídas tardias da doença (MUELLER et al., 2009; ADEKUNLE et al., 2015). Não é muito clara qual sinalização é necessária para a ativação dos hipnozoítos. Acredita-se que picadas de mosquitos *Anopheles* não infectados podem ser um estímulo para ativação dessas formas dormentes (HULDÉN, 2008; WELLS, 2010). Além disso, há especulações de que a febre ou inflamação possam ser gatilho para a ocorrência da próxima recaída (WHITE et al., 2011), bem como, que esses parasitos são geneticamente distintos e programados para se ativar em determinado momento (CHEN, 2007; DE ARAÚJO et al., 2012). A frequência dessas recaídas pode variar de acordo com a imunidade do hospedeiro, idade, grau de exposição à infecção, localização geográfica, carga parasitária inoculada e adesão ao tratamento correto (JOHN et al., 2012; MARKUS, 2015; COMMONS et al., 2020).

A fase eritrocítica inicia-se quando os merozoítos deixam o merossoma e estabelecem contato com os eritrócitos (MILLER et al., 2013; ASHLEY et al., 2018; MILNER, 2018). Os merozoítos livres no sangue invadem as hemácias por um mecanismo muito rápido e dinâmico (HOLDER & BLACKMAN, 1994; WEISS et al., 2015). O processo de invasão do eritrócito é semelhante ao que ocorre nos hepatócitos, inicia-se com a interação do merozoíto com a hemácia, nesta etapa acredita-se que a proteína 1 da superfície de merozoíto (*Merozoite Surface Protein-1* – MSP-1) tenha um importante papel. Para estabelecer e mediar a associação é necessário a mobilização de outras MSPs da superfície do parasito, formando complexos proteicos independentes, capazes de interagir com os receptores presentes no eritrócito a ser invadido, esta etapa é denominada pré-invasão (WEISS et al., 2015; LIN et al., 2016). Ocorre a interação entre o merozoíto e o eritrócito, o parasito reorienta seu complexo apical na superfície celular de modo perpendicular a membrana plasmática, na sequência há a liberação de moléculas como a AMA-1 e a RON-2 que se inserem à célula hospedeira, tornando possível a formação de uma ligação irreversível e conseqüentemente a invasão (BESTEIRO et al., 2011; SRINIVASAN et al., 2013; HORTA et al., 2020).

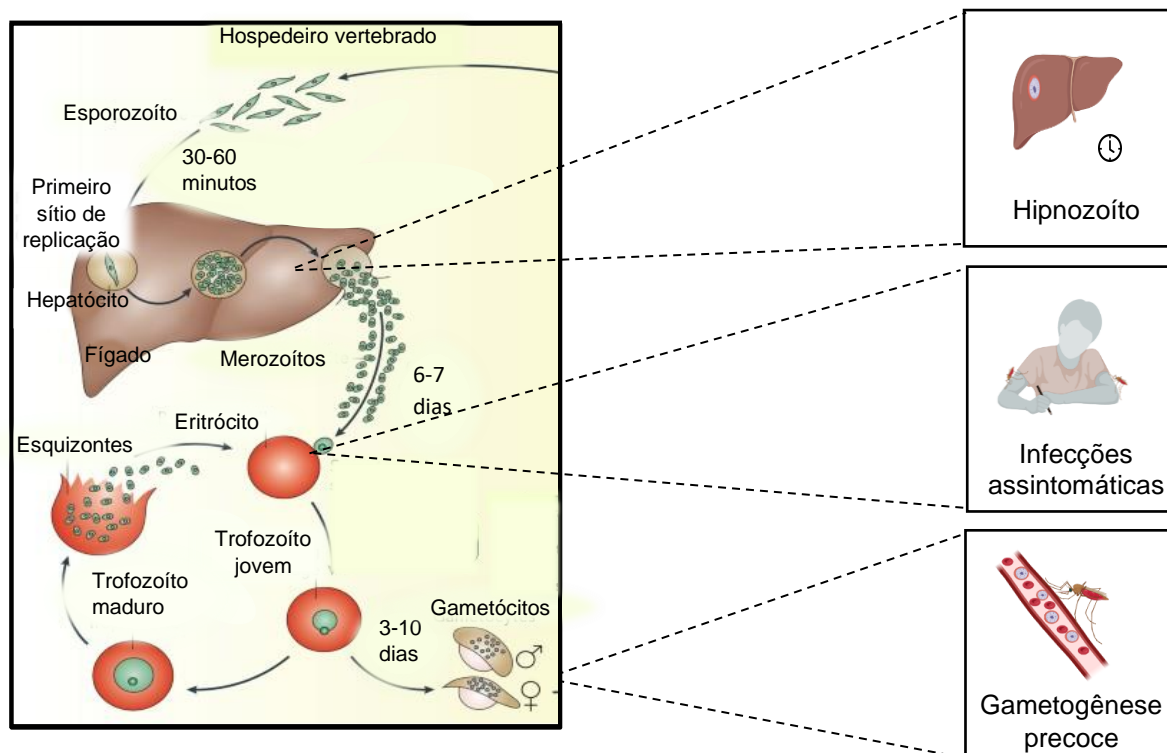


Figura 4- Ciclo biológico do *Plasmodium vivax* no vertebrado. (Adaptado de Phillips et al., 2017).

Posterior à invasão ativa, o parasito encontra-se completamente circundado pelo vacúolo parasitóforo, assim, inicia-se o processo de esquizogonia e cada merozoíto é capaz de originar de 8 a 16 merozoítos que são posteriormente liberados para infectar novos eritrócitos, amplificando a infecção (MILLER et al., 2002). A segmentação do esquizonte pode durar de 24 a 72 horas a depender da espécie de *Plasmodium* infectante. Para o egresso do parasito ocorre a ruptura da hemácia infectada e novamente tem-se a participação da MSP-1 durante o processo. Após ser quebrada por proteólise ela se liga à espectrina do eritrócito e facilita a saída do parasito, através da desestabilização do citoesqueleto da hemácia (DAS et al., 2015). Depois de algumas gerações de merozoítos sanguíneos, ocorre a diferenciação de gametócitos masculinos e femininos, estes ao serem sugados por fêmeas do inseto vetor susceptível irão dar continuidade ao ciclo do parasito (MILLER et al., 2002; COWMAN et al., 2016). O processo de formação dos gametócitos apresenta um padrão diferenciado para as duas principais espécies de plasmódios humanos. Em *P. vivax* os gametócitos aparecem precocemente na circulação periférica antes mesmo do indivíduo apresentar quaisquer sintomas (**Figura 4**). No que diz respeito a *P. falciparum*, o aparecimento dos gametócitos é tardio e coincide com o quadro clínico do paciente (MUELLER et al., 2009; COWMAN et al., 2016). Além disso, é importante

ressaltar que *P. vivax* infecta especificamente reticulócitos que expressam CD71 em sua superfície, essas células muito jovens estão em baixa proporção na circulação, desse modo as infecções por *P. vivax* geram baixas parasitemias e indivíduos infectados frequentemente assintomáticos (**Figura 4**). Tais características refletem desafios no controle das diferentes espécies, dado que para *P. vivax*, mesmo que o paciente busque rapidamente atendimento, já pode ter sido fonte de infecção para os mosquitos susceptíveis. Assim, o *P. vivax* apresenta particularidades biológicas que tornam seu controle mais desafiador quando comparado a *P. falciparum* (MUELLER et al., 2009; COWMAN et al., 2016; MEIBALAN et al., 2017).

1.4. Resposta humoral adquirida durante a malária

A resposta imunológica contra *Plasmodium* inicia-se a partir do reconhecimento de padrões moleculares e a ativação de células da imunidade inata como os neutrófilos, células dendríticas e monócitos (LEORATTI et al., 2012; ANTONELLI et al., 2014; GAZZINELLI et al., 2014). Ocorre uma massiva produção de citocinas, glicoproteínas hidrossolúveis, que atuam como mensageiros químicos para a coordenação da resposta (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2003; LIMA-JUNIOR et al., 2010; ANTONELLI et al., 2020). O cenário inflamatório associado com a apresentação de antígenos do parasito, induzem a ativação de diversas moléculas e fatores de transcrição que acionam a imunidade adquirida ativando as células T e B (AKIMOVA et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2017). É relevante destacar que um dos eventos de maior importância para o desenvolvimento da imunidade parcialmente protetora contra *Plasmodium* é a produção de anticorpos, dentre os quais sobressaem as imunoglobulinas do tipo G e M (COHEN et al., 1961; BOYLE et al., 2015; COCKBURN & SEDER, 2018).

A imunoglobulina G (IgG) está presente na circulação sanguínea do homem e corresponde em cerca de 10 a 20% das proteínas contidas no plasma. É uma glicoproteína composta por 82-96% de proteínas e 4-18% de carboidratos (VIDARSSON et al., 2014). Dentre as cinco classes de imunoglobulinas circulantes no ser humano (IgM, IgD, IgG, IgA e IgE), a IgG constitui cerca de 75% do total de anticorpos séricos em indivíduos saudáveis. Adicionalmente, a imunoglobulina G pode ser dividida em quatro diferentes subclasses que se apresentam com abundâncias distintas a depender do estímulo gerado $IgG1 > IgG2 > IgG3 > IgG4$ (SHAKIB & STANWORTH, 1980). De modo geral, IgG 1 é

a subclasse mais vasta dentre elas (FERRANTE et al., 1990; PANDEY et al., 2010; IRANI et al., 2015). Tais subclasses apresentam diferenças tanto estruturais como funcionais e, portanto, são capazes de potencializar ou mesmo suprimir a resposta imunológica. Podem atuar de inúmeras formas, seja a partir da neutralização direta do antígeno, formação de imunocomplexos, ativação do sistema complemento e de células efectoras (VIDARSSON et al., 2014; IRANI et al., 2015). A imunoglobulina M é secretada como pentâmeros ou hexâmeros solúveis por linfócitos B plasmáticos. Pode apresentar de 10 a 12 sítios de ligação ao antígeno, que a torna mais capaz de ligar ao patógeno se comparado com o IgG. Além de neutralizar patógenos IgM é altamente eficaz em ativar o complemento (LIU et al., 2019; KEYT et al., 2020).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da resposta adaptativa contra os plasmódios são complexos e não muito bem compreendidos, sobretudo quando se trata de infecções ocasionada por *P. vivax* (JANGPATARAPONGSA et al., 2006; JANGPATARAPONGSA et al., 2012; ANTONELLI et al., 2020). A imunidade contra *P. vivax* se estabelece em indivíduos que são constantemente re-infectados pelo parasito, no entanto a proteção concebida é considerada parcial, já que se apresenta em um curto período de tempo no qual o indivíduo fica exposto aos antígenos do parasito. A imunidade adquirida contra *Plasmodium* é silenciada em áreas de baixa transmissão, isso deve-se ao fato de a resposta imunológica ser frequentemente atrasada e não esterilizante. Desse modo, indivíduos que não permanecem em áreas endêmicas, rapidamente perdem seus linfócitos T e B ativos e efetores, indicando que muitas vezes as células de memória formadas só são mantidas através das repetidas exposições (JANGPATARAPONGSA et al., 2012; ANTONELLI et al., 2019). Apesar da resposta gerada ser lenta e incompleta, em áreas endêmicas com as constantes reinfecções, os indivíduos podem desenvolver uma imunidade parcial contra o parasito que é capaz de controlar a parasitemia, bem como, as manifestações clínicas (LUXEMBURGER et al., 1999; ALVES et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2006; WHITE et al., 2014).

Estudos com a intenção de investigar a resposta de células B, bem como os títulos de anticorpos gerados para antígenos de *P. vivax*, têm demonstrado que ainda não há consenso sobre a longevidade da resposta humoral durante a malária (FIGUEIREDO et al., 2017; CHANGROB et al., 2018; PATGAONKAR et al., 2018). A maior parte dos estudos reportam o rápido declínio dos anticorpos após a cura parasitológica dos indivíduos, o que corrobora com o princípio de que as infecções causadas pelos

plasmódios não induzem a produção de células de memória duradouras (ANTONELLI et al., 2019). Contudo ainda existem lacunas sobre a resposta de anticorpos em indivíduos infectados com *P. vivax*, bem como a diferenciação dos linfócitos B e a manutenção de células de memória (FIGUEIREDO et al., 2017; CHANGROB et al., 2018; PATGAONKAR et al., 2018). Em uma área de transmissão instável de malária no estado do Pará, Brasil, houve um estudo que monitorou a permanência da resposta de IgG contra *P. vivax* ao longo dos anos. Foi constatado que a prevalência de IgG positivo para o antígeno do parasito avaliado (MSP-1₁₉), diminuiu significativamente ao longo do tempo, em 2010 (93,4%), 2012 (85,1%) e 2013 (78,3%), fato que corrobora com a premissa de que é importante haver reinfecções para que a resposta de defesa se mantenha presente no indivíduo (COSTA et al., 2020).

A imunidade inata, incluindo a resposta pró inflamatória, são eventos essenciais para o desenvolvimento da imunidade adquirida, na qual destaca-se a ativação e amadurecimento de linfócitos B específicos contra antígenos do parasito, a diferenciação de células de memória e a produção de anticorpos como mecanismos fundamentais para o controle do parasito (STEVENSON & RILEY, 2004; GAZZINELLI et al., 2014; ANTONELLI et al., 2019). A imunidade humoral naturalmente adquirida em áreas endêmicas parece estar mais relacionada com a fase eritrocítica do parasito do que com a tecidual, embora, os antígenos presentes nos esporozoítos e em hepatócitos infectados também podem estar envolvidos (RILEY & STEWART, 2013; ROJAS-PEÑA et al., 2015; COCKBURN & SEDER, 2018). Anticorpos anti-*P. vivax* são verificados contra antígenos específicos do parasito, como AMA-1, MSP-1, MSP-9, DBP e CSP (BRAGA et al., 1998; CUTTS et al., 2014; FOLEGATTI et al., 2017; COSTA et al., 2020). As respostas de IgG para esses antígenos indicam uma exposição recente ou acumulada ao parasito em diversas populações ao longo da Bacia Amazônica (FOLEGATTI et al., 2017; ANTONELLI et al., 2019; COSTA et al., 2020). Contudo, o vínculo entre a produção de anticorpos e a proteção contra doença é uma evidência limitada, já que os exames sorológicos disponíveis não distinguem anticorpos protetores dos não protetores (ANTONELLI et al., 2019).

Durante a infecção causada por *P. vivax*, os antígenos presentes no estágio de merozoíto são mais imunogênicos e promovem altos títulos de anticorpos (RODRIGUES et al., 2005; HAGHI et al., 2012; PIRES et al., 2018). Nesse aspecto pode-se destacar o PvAMA-1 que é uma das moléculas mais imunogênicas (CERÁVOLO et al., 2005), e a

PvMSP-1₁₉ que é altamente imunogênica e induz altos títulos de anticorpos que podem permanecer relativamente estáveis em diferentes áreas de transmissão. Moléculas com esse perfil podem ser utilizadas como marcadores para delimitar áreas de maior ou menor transmissão e regiões que apresentam co-endemicidade de espécies (CERÁVOLO et al., 2005; CHANDRAMOHANADAS et al., 2014; MCCAFFERY et al., 2019; LONGLEY et al., 2022).

1.5. O uso de anticorpos em estudos epidemiológicos

Os anticorpos naturalmente adquiridos por indivíduos imunocompetentes durante o curso de uma doença infecciosa, além de serem extremamente importantes para o estabelecimento de uma resposta adaptativa que potencializa as células efectoras (BOYLE et al, 2015; COCKBURN & SEDER, 2018), eles podem servir como relevantes alvos para identificação de indivíduos expostos a infecção, mas que são silenciosos por não apresentarem sintomas (CUTTS et al., 2014; FOLEGATTI et al., 2017; O'FLAHERTY et al., 2022). Quando se discute sobre uma doença infecciosa não contagiosa, mas que é transmitida via vetor como o que ocorre com a malária, esses indivíduos que portam o parasito e permanecem nas populações indetectáveis, assumem imensa importância (HARRIS et al., 2010). Isso porque mesmo não apresentando parâmetros clínicos nítidos, eles podem servir de fonte de infecção para o mosquito suscetível e proporcionar a manutenção da transmissão local (ALVES et al., 2002; DA SILVA-NUNES et al., 2008; DA SILVA-NUNES et al., 2012).

Dentre os pilares estabelecidos pelo Programa Nacional de Controle da Malária a detecção de indivíduos infectados por meio do diagnóstico rápido e preciso, assim como a administração da terapêutica mais adequada a cada espécie de parasito infectante, se destacam (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Uma vez que os reservatórios são detectados e tratados, há uma conseqüente diminuição da transmissão para o mosquito, refletindo diretamente na incidência e prevalência do número de casos sintomáticos (GRIFFING et al., 2015; WHO, 2021). Essas medidas quando implementadas de maneira correta são eficientes para o controle do *P. falciparum*, fazendo com que haja significativa diminuição do número de casos. Contudo, o mesmo não é verificado para *P. vivax*, justamente pela dificuldade de identificar indivíduos assintomáticos infectados (DA SILVA-NUNES et al., 2008; DA SILVA-NUNES et al., 2012). Neste contexto a pesquisa

por anticorpos específicos contra o parasito pode ser uma estratégia de relevância, já que podem ser eficientes para detectar os casos de indivíduos expostos a infecção e que se encontram assintomáticos (ALVES et al., 2002; HARRIS et al., 2010).

Diversos estudos visam avaliar o perfil de anticorpos como marcadores de exposição ao *Plasmodium* (KIM et al., 2014; FOLEGATTI et al., 2017; LONGLEY et al., 2017; LONGLEY et al., 2021; LONGLEY et al., 2022). Neste contexto a infecção causada por *P. vivax* se destaca, uma vez que seu controle é mais complexo devido às características biológicas inerentes a esta espécie. Dentre estas incluem um ciclo de vida extra eritrocítico, que se estabelece em sítios eritroblásticos como a medula óssea e o baço que são ricos em reticulócitos jovens (KHO et al., 2021). Este acúmulo oculto de parasitos nessas regiões pode sustentar a alta prevalência de infecções assintomáticas e as baixas densidades eritrocíticas que ocorrem nas infecções por *P. vivax* (HARRIS et al., 2010; MOREIRA et al., 2015).

Além disso, como já enfatizado anteriormente, o estágio intra-hepático (hipnozoíto), que pode permanecer incubado ou adormecido por meses a anos após a infecção inicial, e se reativar por motivos ainda não bem esclarecidos, faz com que o indivíduo volte a ser um mantenedor do parasito (CHEN et al., 2007; HULDÉN et al., 2008; DE ARAUJO et al., 2012). Estima-se que os casos de recaídas tardias representem os principais reservatórios de transmissão nas comunidades, com até 80% das infecções detectadas no estágio sanguíneo atribuídas à hipnozoítos (COMMONS et al., 2020). E por fim, a maturação precoce de gametócitos que é uma característica importante desta espécie e faz com que o ser humano uma vez infectado, rapidamente se torne fonte de infecção ao mosquito vetor, antes mesmo de apresentar qualquer sintoma que possibilite procurar atendimento médico (ADEKUNLE et al., 2015; ROBISON et al., 2015; VALLEJO et al., 2016).

Todos esses aspectos comprometem diretamente o controle de *P. vivax* e se tornam uma barreira para a eliminação desta espécie em todo mundo (TAYIPTO et al., 2022). No Brasil, esta problemática é evidente e crescente pois grande parte dos casos na região endêmica são assintomáticos, já que os indivíduos são frequentemente expostos ao parasito e produzem anticorpos que podem conferir proteção, minimizando as manifestações clínicas (BRAGA et al., 2002; HARRIS et al., 2010). Os casos de malária se concentram em áreas rurais, áreas indígenas, garimpos, assentamentos e área urbana

da região da Amazônia legal brasileira que acumula o maior número de casos autóctones no país (**Tabela 1**). A dinâmica de transmissão varia bastante entre os ambientes devido à falta de vigilância epidemiológica, a ocupação desestruturada de hospedeiros que vivem em condições favoráveis a infecção e a presença de mosquitos suscetíveis (DA SILVA-NUNES et al., 2008; DA SILVA-NUNES et al., 2012). Fatos que contribuem para a heterogeneidade da transmissão nessas áreas e comprometem o controle (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Tabela 1- Casos autóctones de no Brasil malária de acordo com a área especial de

Áreas especiais de infecção	2021
	Nº de casos
Rural	50.609
Indígena	45.642
Garimpo	20.468
Urbana	11.413
Assentamento	7.839

Adaptado de: Sivep-Malária/SVS/MS. Dados do Sivep-Malária atualizados em: 14/3/2022.

O deslocamento de pacientes com malária, sejam eles advindos da região amazônica ou de outros países endêmicos, pode favorecer a instalação da transmissão em áreas atípicas para a doença e ocasionar surtos localizados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Esses surtos demoram a ser identificados justamente pela morosidade em buscar atendimento médico, falta de suspeita clínica dos profissionais de saúde e a não expertise com o diagnóstico padrão ouro em área extra-amazônica. Os surtos ocorrem e são mantidos por um dado intervalo de tempo, devido a suscetibilidade de algumas áreas, dentre elas as de mata atlântica, na qual existe a presença de espécies do vetor transmissor (DE LEMOS et al., 2021; DUARTE et al., 2021, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). No ano de 2021 em área extra-amazônica forram notificados 462 novos casos de malária, sendo 321 deles identificados como importados de municípios ou países endêmicos e 114 casos identificados como autóctones (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Na **Figura 5** é possível identificar os municípios da região extra-amazônica que notificaram apenas casos importados, em azul, e que registraram casos autóctones, em vermelho.

Os casos autóctones podem ter origem a partir de um caso importado ou ainda, podem ser casos autóctones de malária humana geralmente assintomáticos em áreas de mata atlântica, os quais o ser humano, primatas não humanos e espécies de mosquitos locais suscetíveis possivelmente participam e promovem a manutenção da cadeia de transmissão (DE PINA-COSTA et al., 2014; MASELLI et al., 2014; DE LEMOS et al., 2021). Há predomínio de pacientes afetados do sexo masculino e que são trabalhadores agropecuários, garimpeiros, turistas e viajantes da faixa etária entre 20 e 49 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Fato este que representa mais um desafio ao combate da doença e nos permite compreender o quão complexo e variável é o limiar de sintomatologia dos pacientes que são expostos esporadicamente a determinadas cepas do parasito.

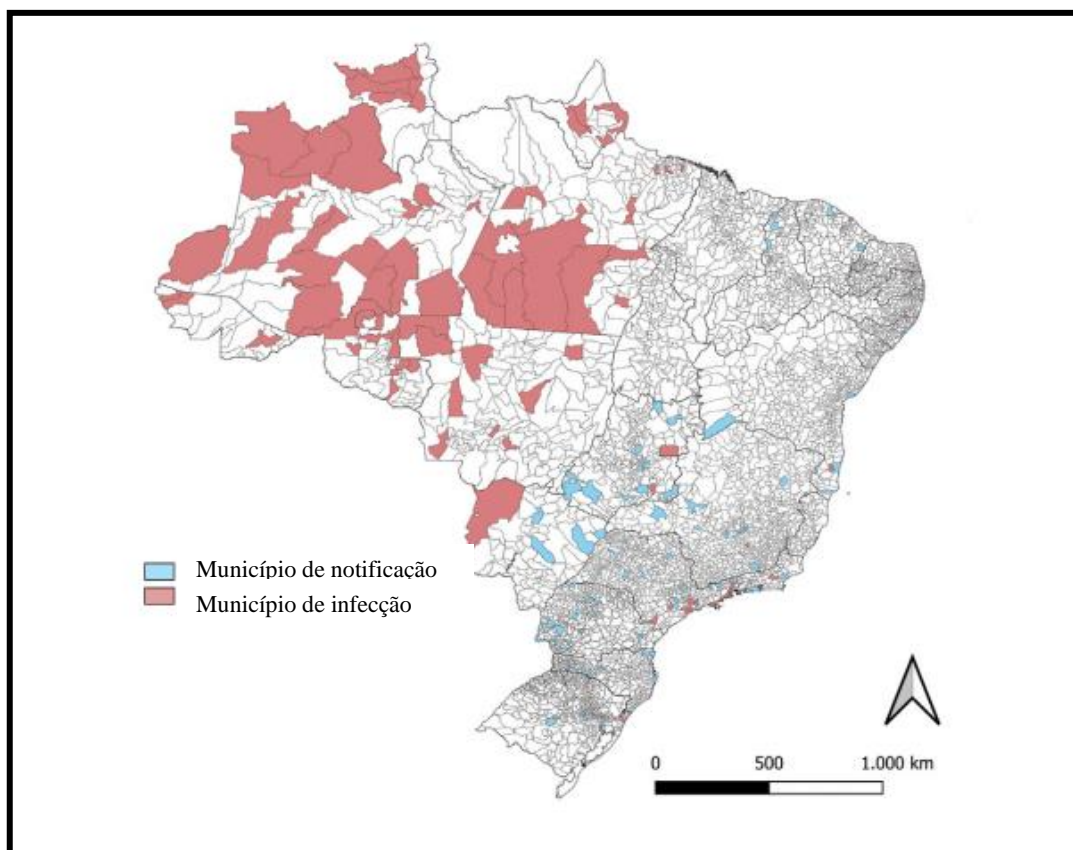


Figura 5. Municípios da região extra-amazônica que notificaram mais casos importados ou autóctones de malária. Adaptado de: Sivep-Malária/SVS/MS e Sinan/SVS/MS. Municípios da região extra-Amazônica marcados em vermelho também podem ter notificado casos. Dados do Sivep-Malária atualizados em 2021.

Assim, anticorpos que são específicos para alvos proteicos de *P. vivax*, podem ser utilizados como uma ferramenta para identificação de indivíduos expostos ao parasito, assintomáticos e muitas vezes indetectáveis pelos exames convencionais (FOLEGATTI et al., 2017; LONGLEY et al., 2017; LONGLEY et al., 2021; LONGLEY et al., 2022; TAYIPTO et al., 2022). Além disso, o uso de marcadores sorológicos de exposição é bastante aceito para a delimitação de áreas de transmissão que apresentam co-endemicidade de espécies, assim como, para mensurar as diferenças na dinâmica de transmissão em certas regiões e analisar, por meio da resposta imune, o histórico de malária em dada localidade. Ainda, a detecção da resposta secundária anti-*Plasmodium* em estudos soroepidemiológicos pode ser favorável para prever potenciais surtos epidêmicos (GIL et al., 2007; GREENWOOD et al., 2008; KIM et al., 2014). Essas ferramentas, em conjunto com as estratégias de controle já pré-estabelecidas, serão essenciais para alcançar a eliminação da doença (O'FLAHERTY et al., 2022).

1.6. Proteína 1 da superfície de merozoíto (MSP-1)

Presente em todas as espécies de *Plasmodium*, as MSPs são sintetizadas no final da esquizogonia e expressas na superfície dos merozoítos, quando os mesmos são liberados dos glóbulos vermelhos (DEL PORTILLO et al., 1991; BABON et al., 2007). Diversas proteínas desta família já foram descritas para *P. falciparum*, dentre as quais, as estruturas genicas de MSP-1, MSP-185, MSP-3a, MSP-3b, MSP-3c, MSP-4, MSP-5, MSP-8, MSP-9 e MSP-10, foram identificadas em *P. vivax* (RAYNER et al., 2002; BABON et al., 2007; PUTAPORNTIP et al., 2009; MIAHIPOUR et al., 2012).

A MSP-1, corresponde a uma das moléculas mais importantes presentes no estágio sanguíneo do *Plasmodium*, uma vez que é essencial para invasão dos eritrócitos pelos merozoítos e apresenta tanto porções conservadas como variáveis de acordo com as espécies (DEL PORTILLO et al., 1991; HOLDER & BLACKMAN, 1994). Somado a isso, a MSP-1 representa um relevante antígeno para resposta imunológica do hospedeiro, já que apresenta porções altamente imunogênicas como o fragmento C-terminal de 19 kDa denominado MSP-1₁₉, capaz de induzir a produção de anticorpos que bloqueiam a invasão das hemácias (BRAGA et al., 1998; EGAN et al., 1999; CHANDRAMOHANADAS et al., 2014), assim como, anticorpos protetores o que torna

a MSP-1, além de um potencial antígeno vacinal, um relevante marcador sorológico de exposição.

Tendo em vista esses aspectos, a MSP-1 tornou-se uma das moléculas mais estudadas no ciclo de vida do parasito, seja como um potencial alvo vacinal ou como biomarcador para infecção e exposição malárica (BRAGA et al., 2002; LADEIA-ANDRADE e t al., 2007; MCCAFFERY et al., 2019).

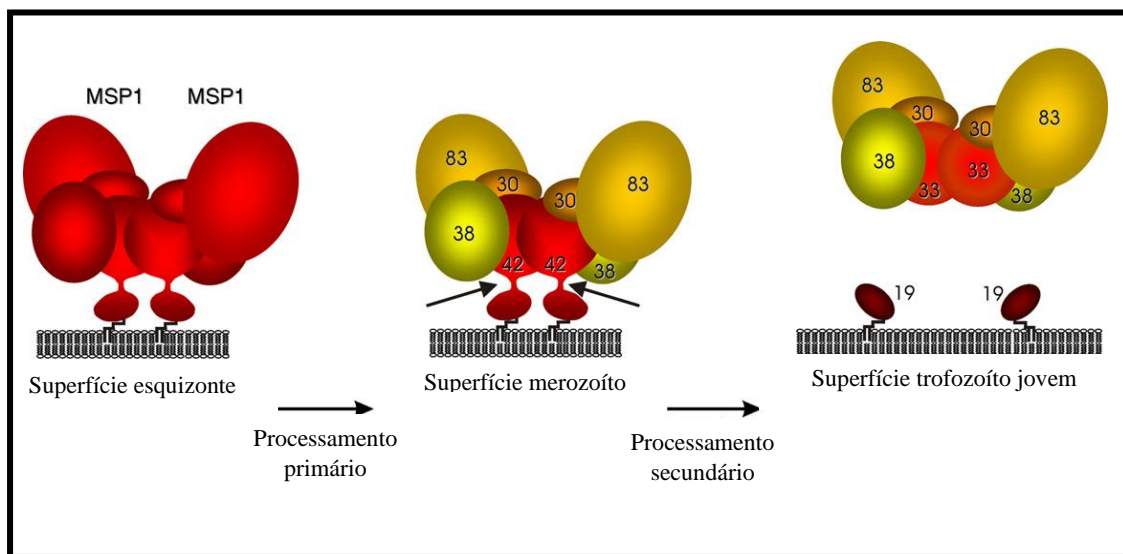


Figura 6. Processamento de MSP-1. (Adaptado de Babon et al., 2007)

Estudos com modelos animais demonstram que antígenos dos estágios sanguíneos estimulam a produção de anticorpos neutralizantes (STOWERS et al., 2001; DUTTA et al., 2005; MCCAFFERY et al., 2019), assim como demonstram a presença de tais anticorpos em indivíduos expostos a áreas endêmicas (SOARES et al., 1997; BRAGA et al., 1998; BRAGA et al., 2002; MORAIS et al., 2005; SCOPEL et al., 2005; BUENO et al., 2008; PANDEY et al., 2010; CHANDRAMOHANADAS et al., 2014; KIM et al., 2014; ROCHA et al., 2017). Ainda nas últimas três décadas, diversos estudos imunoepidemiológicos expõem a alta taxa de imunogenicidade da região C-terminal de *P. vivax* (PvMSP-1₁₉) e as subclasses de IgG dominantes em indivíduos infectados por *Plasmodium* spp. é a IgG1, seguida da IgG3 (BRAGA et al., 2002; MORAIS et al., 2005).

Tais investigações analisam a aquisição de anticorpos IgG contra este antígeno, principalmente em populações que vivem em áreas de alta prevalência de malária, ou mesmo em regiões com variações nas taxas de transmissão (SOARES et al., 1997;

SOARES et al., 1999; CUNHA et al, 2014; LADEIA-ANDRADE et al., 2007; FERNANDEZ-BECERRA et al., 2010; MOURÃO et al., 2012; FOLEGATTI et al., 2017; PUNNATH et al., 2021).

O peso molecular em Kilo Daltons (kDa) da MSP-1 é de aproximadamente 195 kDa, entretanto, no decorrer do amadurecimento dos merozoítos esta molécula é submetida a clivagens proteolíticas sucessivas que originam peptídeos de diferentes tamanhos (**Figura 6**) (MCBRIDE & HEIDRICH et al., 1987; HOLDER et al., 1992). A saber: MSP-1₈₃, MSP-1₃₀, MSP-1₃₈, MSP-1₄₂, MSP-1₃₃ e MSP-1₁₉, dentre as quais, apenas a MSP-1₁₉ é exposta na superfície do parasito na fase de merozoíto e trofozoíto jovem. O fragmento menor (MSP-1₁₉) é ancorado pela glicosilfosfatidilinositol (GPI) e carregado juntamente com o parasito (MCBRIDE & HEIDRICH, 1987; BLACKMAN et al., 1990; HOLDER et al., 1992; BLACKMAN et al., 1994).

Tendo em vista a importância da PvMSP-1 como potencial biomarcador de exposição à infecção malárica, assim como um importante alvo vacinal de fase sanguínea, faz-se necessário a caracterização mais detalhada e específica da resposta de anticorpos contra peptídeos derivados da mesma. Afim de elucidar potenciais marcadores de exposição ao *P. vivax* que sejam aplicáveis em estudos soropidemiológicos e possibilitem, tanto a identificação de reservatórios silenciosos mantenedores da cadeia de transmissão, como compreender melhor as dinâmicas de transmissão nas diferentes áreas nas quais este parasito está presente.

2. JUSTIFICATIVA

A malária é um grave problema de saúde pública por afetar um elevado número de pessoas em áreas tropicais e subtropicais do mundo. Estima-se que um terço da população viva em áreas de risco de infecção e todos os anos ocorrem cerca de 400 a 500 milhões de casos novos ao redor do globo, nos quais *P. vivax* é um dos principais agentes responsáveis.

No Brasil, 99% dos casos de malária ocorrem na região da Amazônia Legal e são, em grande maioria (85%), ocasionados por *P. vivax*. Os casos que ocorrem na região extra-amazônica podem ser classificados como importados de áreas endêmicas, ou como autóctones. Estes merecem atenção uma vez que tiveram um aumento considerável entre os anos de 2020 e 2021 e, além disso, os surtos de malária em estados extra-amazônicos demoram a ser detectados devido ao atraso na suspeita clínica, falta de expertise com o diagnóstico e consequente morosidade na administração do tratamento, fato que piora o prognóstico e aumenta consideravelmente a letalidade dos casos.

Tendo em vista esses aspectos e sabendo dos desafios acerca do controle de *P. vivax* - casos assintomáticos ou oligossintomáticos que servem como fonte de infecção ao vetor, a maturação precoce de gametócitos antes do surgimento dos sintomas e as recaídas tardias por hipnozoítos – torna-se importante a investigação de marcadores sorológicos que permitam estimar a prevalência desta espécie em áreas com diferentes níveis de transmissão e co-endemicidades, bem como em áreas não endêmicas para a detecção de indivíduos mantenedores da transmissão, assim como previsão e delimitação de surtos. Ao delimitar melhor as áreas de ocorrência de *P. vivax* por meio de um *screening* com o uso da sorologia, pode-se detectar indivíduos assintomáticos expostos e possivelmente infectados por este parasito. Esta ação favorece o direcionamento e a implementação de medidas de controle efetivas contra a transmissão, como o diagnóstico e o tratamento de pessoas infectadas.

Com o intuito de contribuir para identificação de biomarcadores de exposição ao *P. vivax*, em nosso grupo de pesquisa foi realizada a identificação de toda sequência de aminoácidos presentes na MSP-1 de *P. vivax* (PvMSP-1). Ao analisar os peptídeos, um alvo foi identificado como potencial biomarcador para malária vivax, o denominado “peptídeo 314”. Este demonstrou ótima reatividade para plasmas de pacientes infectados

e baixa para plasmas de indivíduos não infectados, tornando-se assim um potencial biomarcador para *P. vivax*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de anticorpos contra o peptídeo sintético 314 (p314) derivado da MSP-1 de *P. vivax* como biomarcadores sorológicos de exposição ao parasito.

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o perfil da resposta de anticorpos IgM, IgG e suas subclasses frente ao p314 em pacientes com malária por *P. vivax* e *P. falciparum*;
2. Propor marcadores sorológicos baseados no reconhecimento de p314 para a diferenciação entre as exposições por *P. vivax* e *P. falciparum*;
3. Estimar a duração da resposta imune humoral adquirida contra o p314.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das amostras

Para realização deste estudo, amostras de plasma de pacientes infectados com *P. vivax* (n= 221) ou por *P. falciparum* (n=15) foram obtidas entre o período de fevereiro de 2006 a janeiro de 2017, por meio de punção venosa em tubos contendo anticoagulante (EDTA ou heparina). As amostras dos pacientes foram adquiridas em parceria com Unidades de Saúde localizadas nas regiões Centro-oeste e Norte do Brasil: Hospital Universitário Júlio Muller, em Cuiabá, Mato Grosso (n= 105); Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus, Amazonas (n= 65) e Centro de Pesquisa em Medicina Tropical, em Porto Velho, Rondônia (n=51) e atualmente encontram-se devidamente estocadas na soroteca do Laboratório de Malária, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (**Figura 7**). Amostras de 13 pacientes infectados com *P. vivax* advindas de Porto Velho (RO), foram obtidas em acompanhamento, tendo coleta de plasma no dia do diagnóstico (dia 0) e dois meses após o diagnóstico e início do tratamento (dia 63). As amostras incluídas neste estudo, são provenientes de pacientes que, logo após a detecção do parasito, receberam o tratamento específico para malária vivax, no qual conta com três dias de cloroquina em associação com setes dias de primaquina. Os plasmas controles negativos (n= 48) foram obtidos de indivíduos nunca expostos a infecção, que residem em Belo Horizonte, área considerada não endêmica para malária.

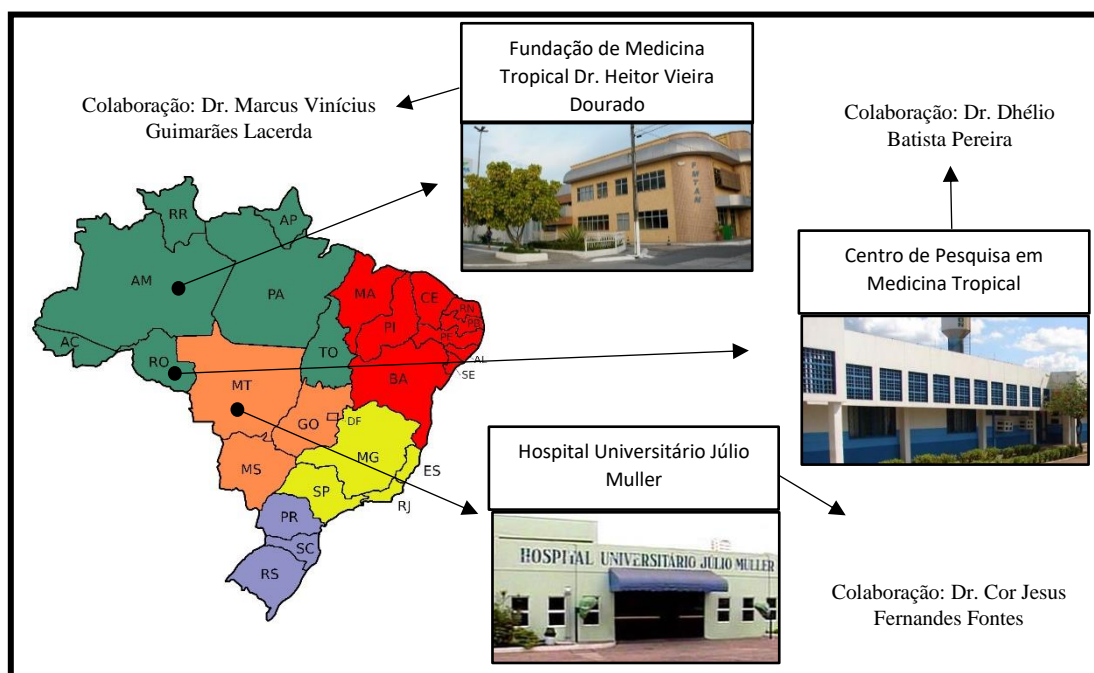


Figura 7: Área de estudo, região Amazônica Brasileira.

A triagem desses pacientes com suspeita clínica de malária, foi feita a partir do exame microscópico de gota espessa, juntamente com a confirmação da infecção por meio da amplificação do gene 18s SSU rRNA de *Plasmodium* (SCOPEL et al., 2004). Além da coleta das amostras de plasma, todos os pacientes participantes do estudo, foram examinados por um especialista o qual aplicou um questionário padrão contendo informações acerca dos dados pessoais do paciente, histórico prévio de malária, perfil demográfico e socioeconômico, bem como, a sintomatologia apresentada no dia do diagnóstico. A parasitemia foi determinada pela contagem de parasitos (parasitos/ μ l de sangue) em lâmina de gota espessa. O diagnóstico padrão é feito por microscopia ótica através da visualização de 100 campos microscópicos e contagem dos parasitos. Vale salientar que após a coleta das amostras os pacientes infectados com *P. vivax* e com *P. falciparum*, foram devidamente tratados de acordo com o que é preconizado pelo Ministério da Saúde por meio do Manual de Terapêutica da Malária. Os indivíduos incluídos neste estudo, apresentaram-se isentos de desnutrição e outras infecções como dengue, hepatite e HIV. Além disso, apenas aqueles que assinaram o termo de consentimento foram incorporados neste trabalho, de acordo com o que normatiza o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 01496013.8.0000.5149, parecer 519.481).

As manifestações clínicas mais relatadas durante o exame médico que caracterizaram os pacientes infectados por *P. vivax* foram: febre (93,8 %), calafrio (89%), mialgia (87,7 %), cefaleia (82,2%), epigastralgia (75%), vômito (56,8%) e náusea (50%). Para os pacientes com malária aguda por *P. falciparum*, as sintomatologias mais frequentes foram: mialgia (100%), cefaleia (93,3), náusea (93,3), calafrio (86,6) e febre (46,6) (Tabela 2).

Tabela 2– Manifestações clínicas relatadas pelos pacientes com malária (n= 235) durante a avaliação médica

Manifestações clínicas (%)	<i>P. vivax</i> (n= 220)	<i>P. falciparum</i> (n= 15)
Calafrio	89	86,6
Cefaleia	82,2	93,3
Epigastralgia	75	-
Febre	93,8	46,6
Mialgia	87,7	100
Náusea	50	93,3
Vômito	56,8	-

4.2. Síntese de peptídeos em membrana de celulose- *SPOT Synthesis*

A sequência primária dos aminoácidos da PvMSP-1, Cepa Sal-I (Gene PVX 099980) (PUTAPORNTIP et al., 2002), foi sintetizado em membrana de celulose por nosso grupo (OLIVEIRA, 2013). Esta metodologia descrita por Ronald Frank em 2002, consiste na síntese automática (*Multiprep Automatic SPOT Synthesizer- Intavis*), em membrana de celulose, de uma série de peptídeos que podem ser utilizados de forma a mapear uma proteína específica e verificar quais deles são reativos a determinados anticorpos.

Ao realizar esta técnica, foram reconhecidos e sintetizados em duas membranas de celulose o total de 580 peptídeos contendo a sequência de 15 aminoácidos, referentes a proteína que apresenta o total de 1751 aminoácidos. Após a montagem das sequências peptídicas, os grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos foram removidos por tratamento com ácido trifluoroacético (TFA), diclorometano e trietilsilano. A membrana contendo os peptídeos sintéticos foi lavada com etanol P.A. e com *Phosphate Buffer Solution 1X* (PBS) por 10 minutos. Posteriormente, uma solução de bloqueio contendo *Bovine Serum Albumine* (BSA) a 3% e sacarose a 5% diluídos em PBS-Tween 0,1% foi adicionada a membrana e mantida por 24 horas. No dia seguinte, a solução de bloqueio foi removida e a membrana lavada com PBS-T 0,1%.

O potencial antigênico de cada peptídeo foi verificado por meio do imunoenensaio de *spot*, que consiste na aplicação de *pools* de plasma de pacientes reunidos em seis grupos distintos: I) pacientes não anêmicos infectados com *P. vivax*; II) pacientes anêmicos infectados com *P. vivax*; III) pacientes não anêmicos infectados com *P. falciparum*; IV) pacientes anêmicos infectados com *P. falciparum*; V) indivíduos não anêmicos sem infecção por *Plasmodium spp.* e VI) indivíduos anêmicos sem infecção por *Plasmodium spp.* Para a revelação, o anticorpo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) diluído na solução de bloqueio foi incubado com a membrana por 1 hora, sob agitação e temperatura ambiente. Para mensurar a reatividade dos *Spots*, o *Software ImageJ 1.45s* foi utilizado. As membranas foram digitalizadas e adicionadas ao programa e cada spot foi marcado manualmente para a quantificação. Para eliminar quaisquer interferências de fundo, a média de reatividade dos pontos não reativos foi subtraída do valor de cada ponto positivo, e o valor de intensidade obtido nesse cálculo foi utilizado nas análises estatísticas.

4.3. Síntese química dos peptídeos solúveis

Desenvolvida por Merrifield e Woolley em 1963, a técnica de síntese peptídica em fase sólida por Fmoc (SPFS), consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel, uma resina, e depois alongar a cadeia peptídica por adições sucessivas de resíduos. Os aminoácidos utilizados foram protegidos pelo grupamento Fmoc (9-fluorenil metil oxicarbonila) em sua função amina e em sua cadeia lateral para evitar reações indesejadas. Ao final da síntese, o último aminoácido é desprotegido e o peptídeo é clivado da resina com o auxílio de uma solução ácida. Foi utilizada a resina de amido (*Rink Amide Resin*), da Novabiochem® protegida por grupos Fmoc, como suporte sólido.

O trabalho descrito anteriormente (OLIVEIRA, 2013), permitiu-nos identificar que o peptídeo 314 [ETKCDEL DLLFN VQN] (p314) derivado da PvMSP-1 é reconhecido com exclusividade por anticorpos presentes nos plasmas de pacientes com infecção patente por *P. vivax*. Logo, este peptídeo foi selecionado como candidato a biomarcador de infecção por *P. vivax* (p314) (Registro de patente: BR1020220203105) (Anexo).

Tabela 3 - Sequência de aminoácidos do peptídeo 314 derivado da PvMSP-1

Peptídeo	Sequência em formato FASTA
Peptídeo 314 derivado da PvMSP-1	E-T-K-C-D-E-L-D-L-L-F-N-V-Q-N

Este peptídeo, determinado a partir da imunorreação em membrana de celulose, foi sintetizado na forma solúvel, com a utilização de um sintetizador automático, um robô MultiPrep (*Intravis Bioanalytical Instruments, Nattermannallee, Alemanha*), conforme descrito anteriormente por Gausepohl e colaboradores em 1992. Nesta fase do trabalho, contamos com a colaboração da Profa. Dra. Daniella Castanheira Bartholomeu do laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia ICB, UFMG.

Tabela 4- Detalhamento dos aminoácidos utilizados na síntese do peptídeo 314

Aminoácido	Sigla	Formato FASTA
Glutamato	Glu	E
Treonina	Thr	T
Lisina	Lys	K
Cisteína	Cys	C
Aspartato	Asp	D
Leucina	Leu	L
Fenilalanina	Phe	F
Asparagina	Asn	N
Valina	Val	V
Glutamina	Gln	Q

O procedimento foi feito com a adição de uma cisteína extra na porção N- e C-terminal dos peptídeos, os quais foram amidados na porção C-terminal e acetilados na N-terminal. Em seguida, há a exposição e liberação da resina utilizando uma solução composta por 95% de TFA, 2,5% de triisopropilsilano e 2,5% de água. Posteriormente, os peptídeos foram filtrados e precipitados com éter etílico frio. Após a centrifugação, o éter foi descartado e os peptídeos foram liofilizados, pesados, dissolvidos em água ultrapura e armazenados a -20°C até a utilização em experimentos seguintes. As massas moleculares foram previstas com PepCalc – *Peptide property calculator (Innovagen)* (<https://pepcalc.com/>) e confirmadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF-modo linear).

4.4. Ensaio imunoenzimático- (*Enzyme-linked immunosorbent assay* -ELISA)

Anticorpos IgM, IgG e subclasses contra o p314 foram detectados em amostras de plasma obtidas de pacientes infectados com *P. vivax*, pacientes infectados com *P. falciparum* e indivíduos não infectados, por meio do ensaio imunoenzimático. Para isso, cada poço de uma microplaca de poliestireno de 96 poços (*Corning Incorporation, Corning, NY, EUA*) foi revestido com 2 ng/μL do peptídeo (padronizado por OLIVEIRA, 2019), em tampão bicarbonato-carbonato (pH 9,6; 0,1 M) e incubado durante 24 horas a 4°C. As placas foram bloqueadas com BSA 1% diluído em PBS 1X pH 7,4 e mantidas a 4°C durante 24 horas. Em seguida, para a detecção de IgM, IgG e subclasses anti-p314,

foram adicionados aos poços os plasmas dos doadores incluídos neste estudo, os quais foram testados individualmente, em duplicata e diluídos na concentração de 1:100 em PBST 0,05% contendo 0,1% de BSA. Após a aplicação dos plasmas, as placas foram incubadas por 2 h a 37°C. Na sequência quatro lavagens com PBST 0,05% foram realizadas, as placas foram incubadas com anti-IgM (1:400), anti-IgG conjugado com peroxidase (1:2000) ou com anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 ou anti-IgG4 (1:500) tais concentrações foram previamente padronizadas (Sigma Aldrich), diluídos em PBST 0,05% com 0,1% BSA, por 90 minutos a 37°C. Para mensurar as subclasses de IgG, após a adição do anticorpo secundário aplicou-se a estreptovidina (1:500) diluída em PBST 0,05%, durante 60 minutos a 37°C. A ligação foi revelada usando 0,5 mg/mL de substrato de dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich) diluído em tampão fosfato-citrato 0,05 M, pH 5,0, e a reação foi interrompida com 4M H₂SO₄.

A densidade óptica (DO 492 nm) foi determinada em um espectrofotômetro de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific). A análise da curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) foi utilizada para determinar o limiar de positividade (valores de corte), que foi definido como o ponto na curva ROC onde a sensibilidade e a especificidade do teste estavam mais próximas. Os níveis de anticorpos IgM, IgG e subclasses foram expressos como índice de reatividade (IR), calculado como a razão entre a densidade óptica média (OD) de cada duplicata de amostra e a OD média mais três desvios padrão das amostras de indivíduos não infectados e nunca expostos a infecção.

4.5. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados no *software* GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, CA, EUA). A avaliação da normalidade dos dados foi feita a partir do teste estatístico de D'Agostino-Pearson e para dados paramétricos utilizou-se o Teste T para análise de duas variáveis, ou o One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para comparação entre três grupos ou mais. Em casos de dados não paramétricos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney para comparação entre duas variáveis e o teste de Kruskal-Wallis, com o teste de Dunn na sequência, para avaliação de três grupos ou mais. Para a avaliação de dados pareados utilizou-se o teste de Fredman e em análise de associação entre duas variáveis foi realizado o teste de correlação de Spearman. A análise da curva ROC foi incluída para avaliar a sensibilidade e especificidade dos anticorpos anti-p314

em marcar as exposições ao *P. vivax*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Análise dos parâmetros clínicos, epidemiológicos e demográficos da população de estudo.

A média de idade dos pacientes com malária vivax foi de 36,6 anos, e os com malária falciparum, de 39,6 anos. No que se refere ao número de episódios prévios de malária, verificou-se que os pacientes infectados com *P. vivax* relataram, em média, 6,4 episódios anteriores, enquanto pacientes com *P. falciparum*, a média foi de 11,7. Quanto a parasitemia, a média de parasitos/ μL de sangue foi de 5.243 para os pacientes infectados por *P. vivax* e de 4.511 para pacientes infectados com *P. falciparum* (**Tabela 5**). Com relação aos parâmetros hematológicos, constatou-se que os pacientes com malária vivax apresentam, em média, nível de hemoglobina igual a 13,4 (g/dL) e porcentagem de hematócrito igual a 40,1%. Os pacientes com malária falciparum, por sua vez, apresentam concentração de hemoglobina de 12,8 (g/dL) e 38,08 de hematócrito. A contagem média de plaquetas e de leucócitos foi de 121.859 e 5.655, respectivamente, em pacientes com malária vivax e de 131.538 e 5.157, em pacientes com malária falciparum (**Tabela 5**). Esses dados evidenciam que os parâmetros analisados dentro da população de estudo são similares e, portanto, não influenciam a resposta de anticorpos verificada.

Tabela 5 – Caracterização da população de estudo

Parâmetros clínicos, epidemiológicos e demográficos	<i>P. vivax</i> (n= 220) (Média \pm Desvio padrão)	<i>P. falciparum</i> (n= 15) (Média \pm Desvio padrão)	P valor
Idade (anos)	36,6 \pm 13,1	39,6 \pm 12,3	0,5812
Episódios prévios de malária	6,4 \pm 12,0	11,7 \pm 12,2	0,0559
Parasitemia (parasitos/ μL sangue)	5.243 \pm 8.703	4.511 \pm 8.329	0,2336
Hemoglobina (g/dL)	13,4 \pm 2,0	12,8 \pm 2,1	0,5618
Hematócrito (%)	40,1 \pm 6,0	38,08 \pm 6,2	0,6280
Plaquetas (células/ mm^3 sangue)	121.859 \pm 41.152	131.538 \pm 47,511	0,8795
Leucócitos (células/ mm^3 sangue)	5.655 \pm 2.039	5.157 \pm 1,594	0,2617

5.2. BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do peptídeo 314.

O programa BLAST é um algoritmo desenvolvido para realizar buscas e comparar sequências biológicas contra um banco de dados que contém informações já depositadas. Ao fazer uma busca, a ferramenta retorna o alinhamento com as sequências mais similares de acordo com a sequência referência pesquisada. Ao avaliar a similaridade do peptídeo 314 em comparação com outras sequências já depositadas na *National Library of Medicine* para o gênero *Plasmodium*, verificou-se apenas o alinhamento com a MSP-1 de *Plasmodium vivax* (Tabela 6 e 7). Quando a busca é realizada excluindo o gênero *Plasmodium*, a similaridade com outros organismos é abaixo de 40%, o que destaca este peptídeo como sendo representativo e específico para PvMSP-1. Esses dados reforçam o potencial do peptídeo em ser biomarcador de *P. vivax* e vão de encontro com os achados de Oliveira, 2013.

Tabela 6 – Alinhamento do p314 no BLAST

Proteína de superfície de merozoíto-1 [<i>Plasmodium vivax</i>]				
Estatísticas de alinhamento #1				
Pontuação	Valor-e	Identidade	Positividade	Lacunas
52.8 pts (117)	2e-09	15/15 (100%)	15/15 (100%)	0/15 (0%)
consulta	1	ETKCDELDLLFNVQN	15	
PvMSP-1	901	ETKCDELDLLFNVQN	915	

Tabela 7 – Similaridade da sequência de p314 com Gênero *Plasmodium*

Organismo	Nome Blast	Pontos	Número de alinhamentos
<i>Plasmodium</i>	Apicomplexa		143
<i>Plasmodium vivax</i>	Apicomplexa	52.8	139
<i>Plasmodium vivax</i> Norte coreano	Apicomplexa	49.0	2
<i>Plasmodium vivax</i> Índia VII	Apicomplexa	49.0	1
<i>Plasmodium vivax</i> Brasil I	Apicomplexa	49.0	1

5.3. Predição *in silico* de epítomos de células B da PvMSP-1 e do peptídeo 314.

Ainda anterior a detecção de anticorpos, verificou-se *in silico* o potencial do peptídeo em desencadear a produção de anticorpos específicos. Logo, para determinar os resíduos de aminoácidos do peptídeo 314 importantes para o reconhecimento por anticorpos, realizou-se a predição de epítomos lineares de células B, *in silico*, através do *software* BepiPred 2.0, utilizando-se um ponto de corte de 0,5. De acordo com a predição, o peptídeo 314 está localizado em uma região da proteína predita como epítomo para células B (**Figura 8**), porém, quando a predição é realizada utilizando-se apenas a sequência de aminoácidos do peptídeo, apenas uma região composta por sete aminoácidos (DEL DLLF – Aspartato, Glutamato, Leucina, Aspartato, Leucina, Leucina e Fenilalanina) foi considerada como um potencial epítomo de células B (**Figura 8**). Os cálculos de predição realizados pelo *software*, levam em consideração os aminoácidos adjacentes, assim, ao analisar a sequência completa da proteína PvMSP-1 tem-se uma predição mais generalista e ao analisar apenas o peptídeo é obtido uma predição mais precisa.

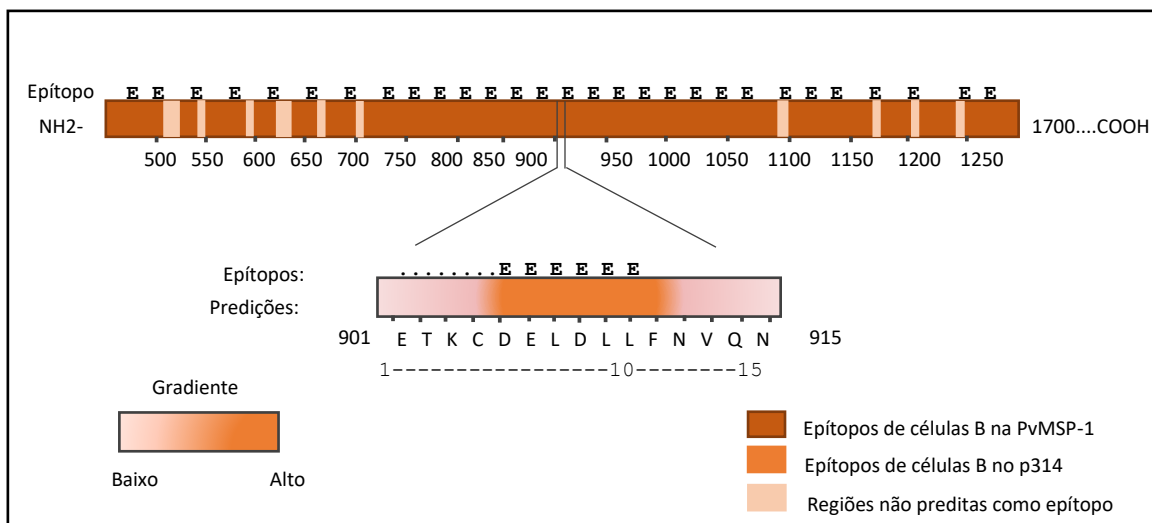


Figura 8: Predição, *in silico*, de epítomos lineares de células B na proteína PvMSP-1, cepa Sal I. O peptídeo 314 é constituído pelos aminoácidos 901 a 915 da PvMSP-1 e se encontra localizado em uma porção considerada como potencial epítomo de células B. A porção laranja escura indica os epítomos previstos na PvMSP-1 pelo *software* BepiPred 2.0, a porção laranja clara indica os epítomos previstos no peptídeo e, a porção rosa clara indica as regiões não consideradas epítomos levando em consideração a proteína inteira e apenas o peptídeo.

5.4. Detecção de anticorpos IgM e IgG anti-p314 em pacientes com *P. vivax*, *P. falciparum* e não infectados.

Após a obtenção de evidências que o peptídeo pode ser um interessante alvo da resposta imune adquirida, partiu-se para a avaliação dos anticorpos gerados contra o mesmo. Os níveis de anticorpos IgM e IgG contra o peptídeo 314 foram medidos nos plasmas dos indivíduos de cada um dos grupos estudados. Ao analisar os níveis de anticorpos IgM anti-p314, não foram observadas diferenças significativas entre os pacientes infectados com *P. vivax* (Mediana: 1,042; percentil 25%-75% [0,7000- 1,429]) *versus* indivíduos não infectados (Mediana: 0,9785; percentil 25%-75% [0,7020- 1,384]) (Figura 9).

Em contrapartida, os níveis de anticorpos IgG anti-p314 mensurados foram significativamente maiores em pacientes infectados com *P. vivax* (Mediana: 1,068; percentil 25%-75% [0,6845- 1,549]) em comparação com os indivíduos não infectados (Mediana: 0,8155; percentil 25%-75% [0,6214- 1,165]) ($p= 0,0153$). Contudo, mesmo havendo diferenças significativas é visualizado que plasmas de indivíduos não infectados e nunca expostos à infecção malárica apresentam anticorpos contra o peptídeo. Este fato

compromete o uso do IgG total anti-p314 como biomarcador sorológico de exposição por *P. vivax* (Figura 9).

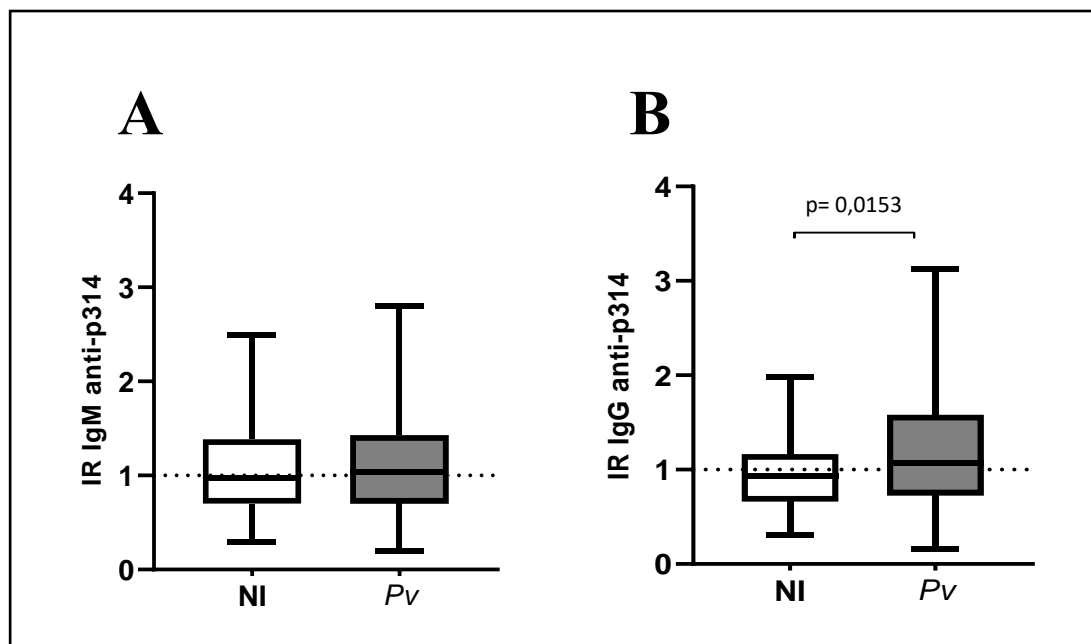


Figura 9. Níveis de IgM e IgG contra o p314. Os níveis de anticorpos em plasmas de pacientes com malária vivax (*Pv*) (n= 220) e indivíduos não expostos à malária (NI) (n= 48) foram determinados por ELISA. *A linha pontilhada representa os índices positivos > 1 e negativos < 1.

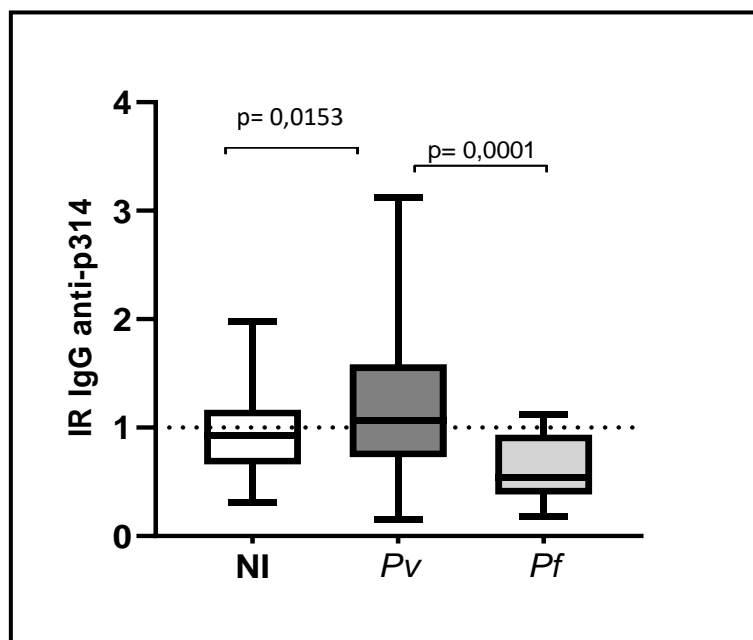


Figura 10. Níveis de IgG contra o p314. Os níveis de anticorpos em plasmas de pacientes com malária vivax (*Pv*) (n= 220), pacientes com malária falciparum (*Pf*) (n= 15) e indivíduos não expostos à malária

(NI) (n= 48) foram determinados por ELISA. *A linha pontilhada representa os índices positivos > 1 e negativos < 1.

Ao incluir a análise de IgG em plasmas de pacientes infectados com *P. falciparum* foi verificado uma diferença nítida entre os níveis de anticorpos contra o peptídeo em indivíduos infectados com *P. vivax* (Mediana: 1,068; percentil 25%-75% [0,6845- 1,549]) versus os infectados com *P. falciparum* (Mediana: 0,5436; percentil 25%-75% [0,5000- 0,9903]) (p=0,0001) (**Figura 10**). As amostras de *P. falciparum* não foram incluídas na análise de IgM, pois os resultados obtidos com essa imunoglobulina não foram promissores para diferenciar plasmas infectados dos não infectados. Além disso, devido a insuficiência de tais amostras, optamos em utiliza-las apenas com as subclasses de IgG.

5.5. Avaliação de anticorpos IgM e IgG anti-p314 em amostras de acompanhamento em pacientes com malária vivax.

Com o intuito de verificar a permanência de anticorpos IgM e IgG contra o p314 após a cura, e na ausência de infecção patente, utilizamos plasmas de pacientes infectados com *P. vivax* obtidos no dia do diagnóstico de malária por gota espessa (dia 0) (IgM- mediana: 1,382; percentil 25%- 75% [1,042- 1,674]); (IgG- mediana: 1,132; percentil 25%- 75% [0,7039- 1,357]) e seus plasmas correspondentes após 63 dias do diagnóstico seguido do tratamento (dia 63) (IgM- mediana: 1,043; percentil 25%-75% [0,6351- 1,544]); (IgG- mediana: 0,8444; percentil 25%-75% [0,6411- 0,9984]) (**Figura 11**).

Foram realizadas análises pareadas com amostras de 13 pacientes correspondentes ao acompanhamento e todos os *outliers* foram removidos para a avaliação (**Figura 11**). De acordo com os dados apresentados, não foram verificadas diferenças significativas entre os níveis de IgM e IgG totais com relação aos dias 0 e 63 na análise proposta. Contudo, sabe-se que anticorpos totais persistem para além da infecção e este fato não desestimula a continuidade da investigação com as subclasses de IgG.

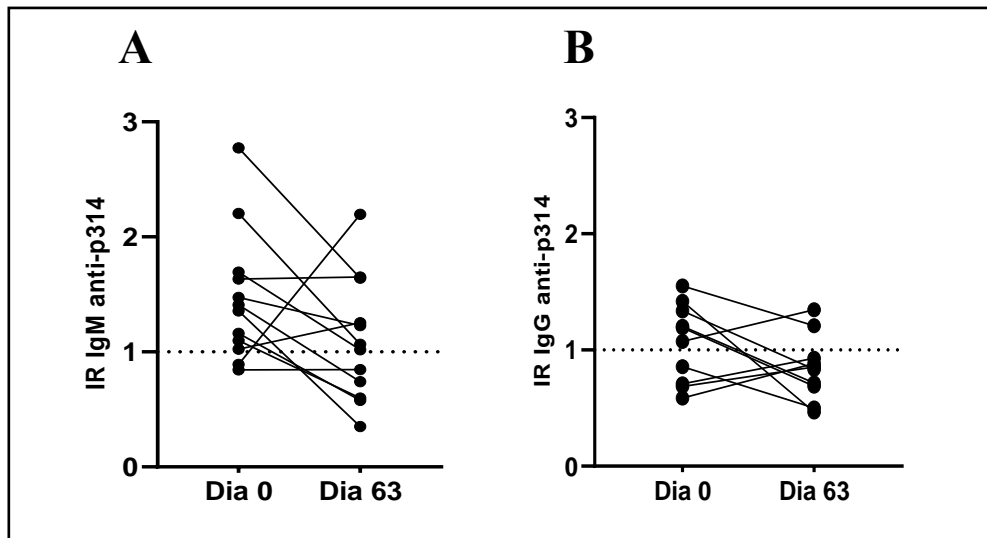


Figura 11. Níveis de IgM e IgG contra o peptídeo 314 em amostras de pacientes com acompanhamento. Os anticorpos foram mensurados por ELISA no plasma dos indivíduos infectados com *P. vivax* no dia 0 e no dia 63. Análises pareadas (n=13). *A linha pontilhada representa os índices positivos > 1 e os negativos < 1.

5.6. Correlação da parasitemia com os níveis de anticorpos IgM e IgG anti-p314.

A correlação entre a parasitemia (parasitos por μL de sangue), presente nos plasmas de pacientes infectados com *P. vivax* e os níveis de anticorpos IgM e IgG anti-p314 foram avaliados. A correlação entre as variáveis foi baixa tanto para os níveis de anticorpos IgM ($r = 0,1077$), quanto para os IgG anti-p314 ($r = 0,2151$) (**Figura 12**).

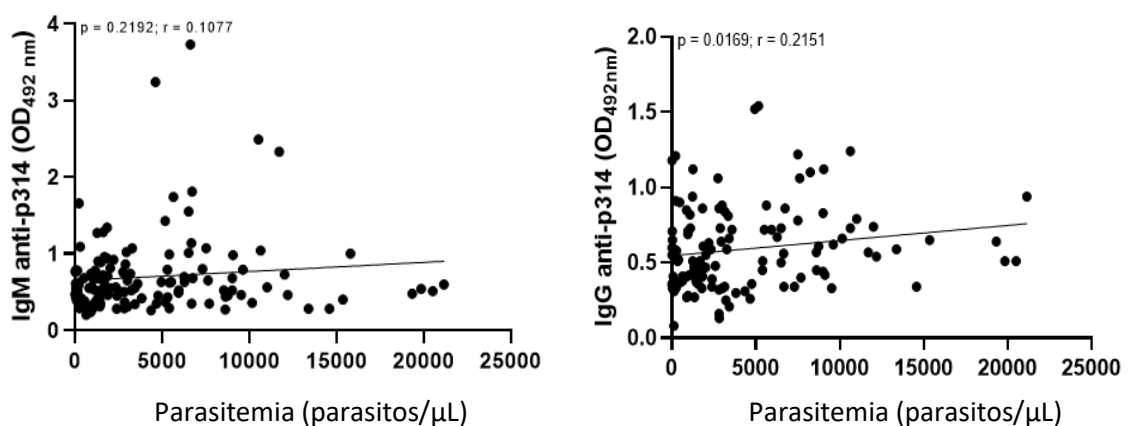
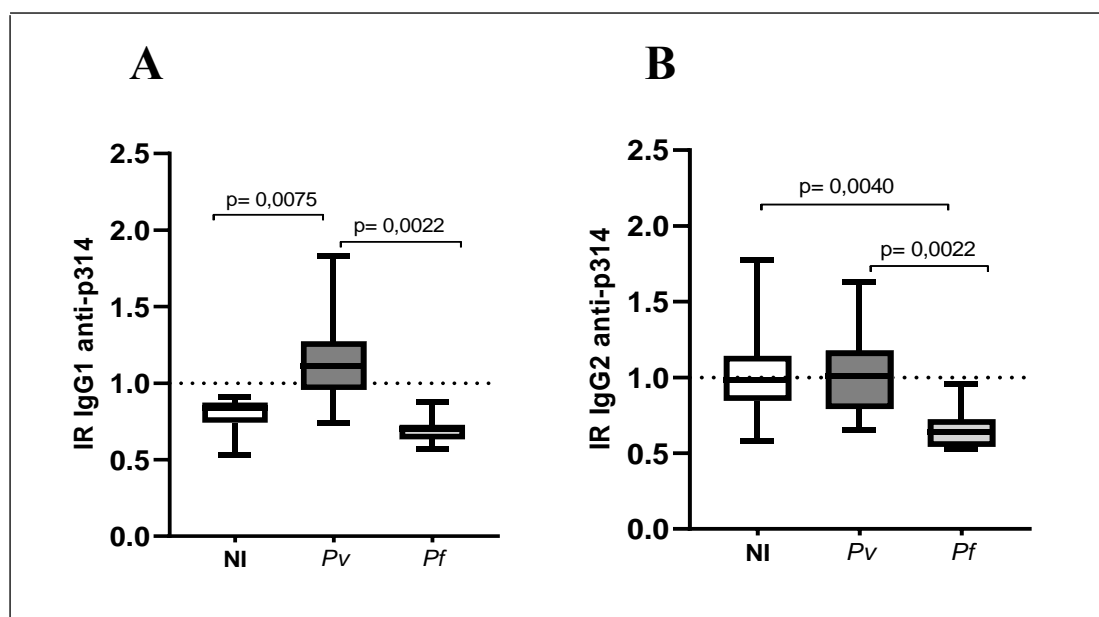


Figura 12. Associação entre parasitemia e níveis de anticorpos contra p314. Correlação não paramétrica de Spearman entre os níveis de IgM (A) e IgG (B) contra o p314 e parasitemia em indivíduos infectados por *P. vivax*.

5.7. Subclasses de IgG anti-p314 como biomarcadores de exposição.

Tendo em vista que as subclasses de IgG indicam respostas mais refinadas e portanto podem ser mais específicas como biomarcadoras de exposição a *P. vivax*, partiu-se para a avaliação dos níveis de anticorpos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 contra o p314 utilizando plasmas de 30 indivíduos não infectados, nunca expostos a área de transmissão malárica, 30 pacientes infectados com *P. vivax* e sete pacientes infectados com *P. falciparum* (número reduzido devido a insuficiência de amostras), (**Figura 13**). Foi demonstrado diferença significativa entre os níveis de IgG1 e IgG3 anti-p314 presentes em pacientes infectados com *P. vivax* versus pacientes infectados com *P. falciparum* ($p=0,0022$), ($p=0,0138$), e indivíduos não infectados ($p=0,0075$), ($p=0,0323$) respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que a subclasse IgG1 anti-p314 pode ser considerada um potencial biomarcador sorológico de exposição por *P. vivax*.

Além disso, os anticorpos IgG2 anti-p314 apresentam níveis estatisticamente elevados quando avaliados em pacientes infectados com *P. vivax* versus pacientes infectados com *P. falciparum* ($p=0,0022$) e para infectados com *P. falciparum* versus não infectados ($p=0,0040$), contudo não há diferença entre os plasmas não infectados daqueles infectados por *P. vivax*, o que compromete o uso dessa subclasse como biomarcador de exposição (**Figura 13**).



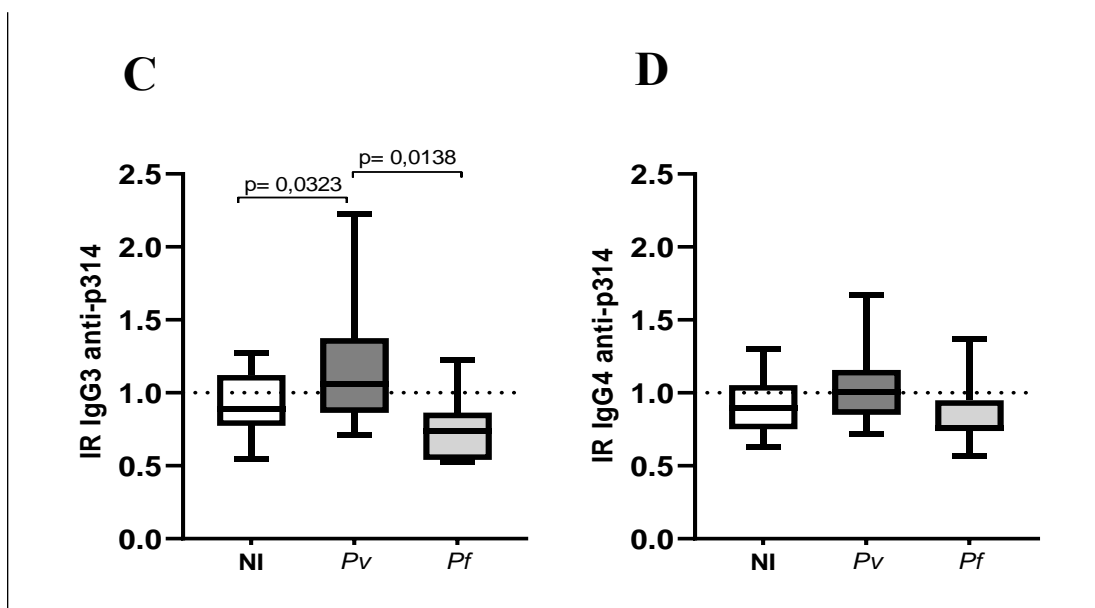


Figura 13. Níveis de IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) e IgG4 (D) contra o peptídeo 314 em indivíduos não infectados, pacientes com *P. vivax*, pacientes com *P. falciparum*. *A linha pontilhada representa os índices positivos > 1 e os negativos < 1.

Com relação aos níveis de IgG4 anti-p314 não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos avaliados (**Figura 13**). Ainda, vale ressaltar que não foram visualizadas correlações positivas entre os níveis de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 anti-p314 e a parasitemia dos pacientes. Os valores de mediana e percentil 25%-75% para cada subclasse de IgG anti-p314 são detalhados na **Tabela 8**.

Tabela 8- Valores de mediana e percentil 25%-75% para cada subclasse

Subclasse	Mediana			Percentil 25%-75%		
	NI	Pv	Pf	NI	Pv	Pf
IgG1	0,8379	1,115	0,6996	0,7417- 0,8741	0,9568- 1,273	0,6329- 0,7284
IgG2	0,9844	1,009	0,6367	0,8452- 1,143	0,7915- 1,179	0,6367- 0,9576
IgG3	0,8856	1,063	0,7410	0,7745- 1,122	0,8644- 1,374	0,5399- 0,8645
IgG4	0,8968	1,006	0,7625	0,7512- 1,053	0,8502- 1,157	0,7388- 0,9481

5.8. Subclasses anti-p314 em amostras de acompanhamento.

Uma vez constatado que subclasses de IgG anti-p314 representam potenciais marcadores sorológicos de exposição por *P. vivax*, avaliamos seus níveis em plasmas de pacientes obtidos no dia do diagnóstico (dia 0) e dois meses após o diagnóstico e tratamento específico para malária vivax (dia 63). Os testes foram realizados de forma pareada com 13 pacientes em acompanhamento com plasmas correspondentes obtidos no dia 0 e no dia 63 (**Figura 14**); e de maneira não pareada com todos os pacientes que tiveram coleta no dia do diagnóstico (dia 0) totalizando 30 amostras, e 13 amostras obtidas dos pacientes que retornaram no dia 63 pós-tratamento e na ausência de infecção patente (**Figura 15**).

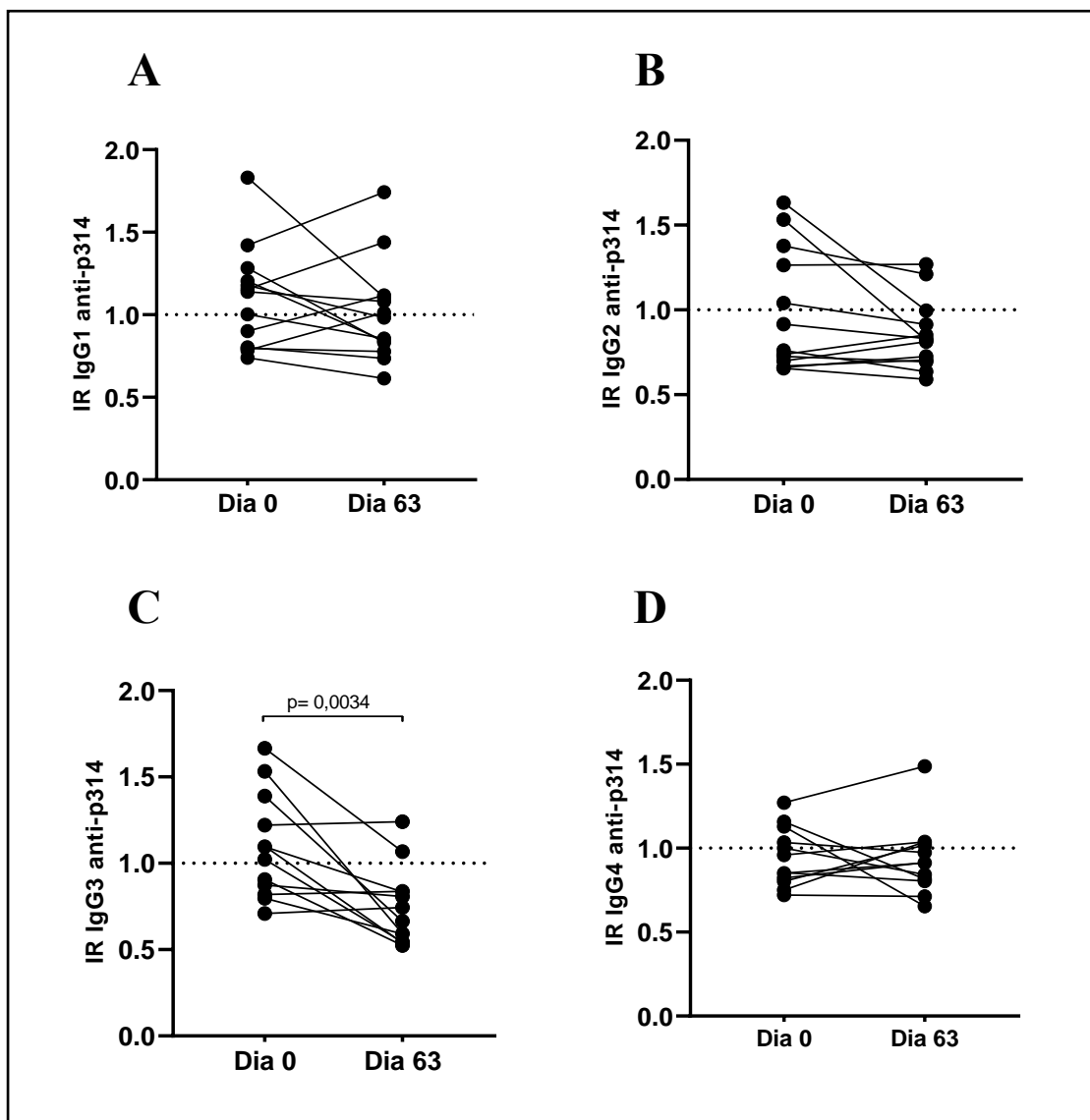


Figura 14. Níveis de IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) e IgG4 (D) contra o peptídeo 314 em amostras pareadas de pacientes de acompanhamento. No dia do diagnóstico (dia 0) e dois meses após o tratamento

(dia 63). Análise pareada (n = 13). *A linha pontilhada representa os índices positivos > 1 e os negativos < 1.

Em avaliações pareadas, foram observadas diferenças significativas entre os níveis dos anticorpos IgG3 anti-p314 entre o dia 0 e o dia 63 ($p= 0,0034$) (**Figura 14**). Para as demais subclasses IgG1, IgG2 e IgG4 não foram verificadas diferenças nos plasmas estudados, entre o dia 0 e o dia 63 (**Figura 14**). Além disso, em análises não pareadas, dentre todas as subclasses avaliadas, apenas o IgG3 anti-p314 apresentou queda significativa de níveis entre o dia 0 e o dia 63 ($p= 0,0134$) (**Figura 15**). Detalhamento das medianas e percentil 25%-75% obtidos para cada subclasse no dia 0 e dia 63 (**Tabela 9**).

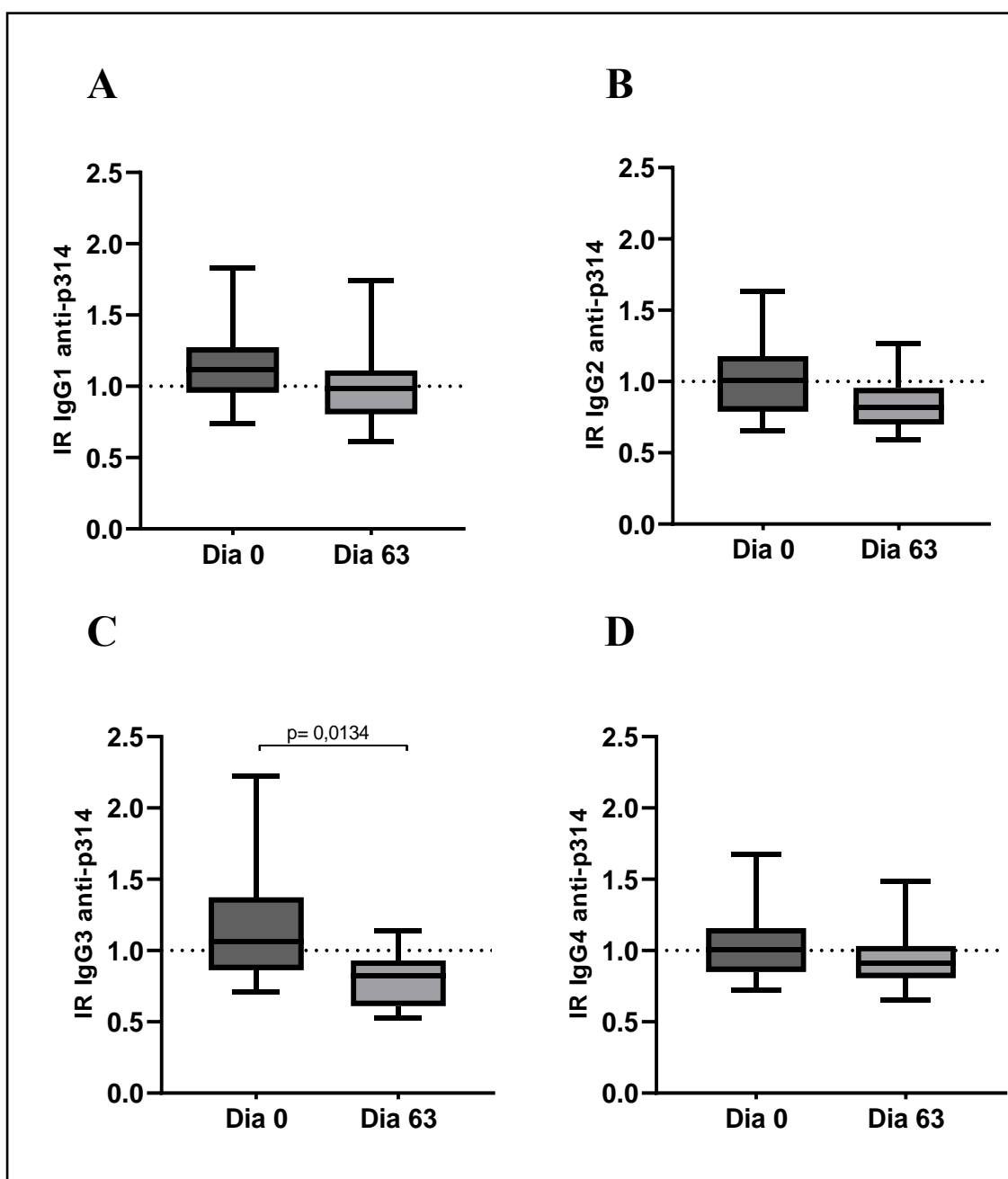


Figura 15. Níveis de IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) e IgG4 (D) contra o peptídeo 314 em amostras não pareadas de pacientes de acompanhamento. No dia do diagnóstico (dia 0) e dois meses após o tratamento (dia 63). Análise não pareada (n dia 0= 30; n dia 63= 13). *A linha pontilhada representa os índices positivos > 1 e os negativos < 1.

Tabela 9- Valores obtidos para cada subclasse

Subclasse	Mediana		Percentil 25%-75%	
	Dia 0	Dia 63	Dia 0	Dia 63
IgG1	1,140	0,9826	0,7990- 1,243	0,8049- 0,9826
IgG2	0,7607	0,8203	0,6837- 1,321	0,6992- 0,9552
IgG3	1,059	0,7045	0,8331- 1,347	0,5553- 0,8374
IgG4	0,9069	0,9136	0,8073- 1,105	0,8072- 1,0320

5.9. Análise da Curva ROC para IgG, IgG1 e IgG3 anti-p314

Devido aos resultados obtidos com IgG total, IgG1 e IgG3 anti-p314 tornou-se interessante verificar a especificidade e sensibilidade desses anticorpos anti-p314 em marcar especificamente as exposições ao *P. vivax* e para isso foram realizadas análises junto a curva ROC. Foi observado, em relação aos níveis de IgG no plasma de indivíduos não infectados por *P. vivax versus* os plasmas de indivíduos infectados por esta espécie de *Plasmodium*, uma especificidade (77,4%) e sensibilidade (78,9%) (**Figura 16**). As análises de IgG1 junto a curva ROC foram promissoras, com sensibilidade (83,3%) e especificidade (97,06%) desses anticorpos contra o p314 na comparação de indivíduos não infectados por *P. vivax versus* os infectados com *P. vivax* (**Figura 16**). Em contrapartida, ao avaliar a sensibilidade e especificidade de IgG3 anti-p314 foram observadas 60,71% e 59,38% respectivamente, na comparação entre os plasmas de indivíduos não infectados por *P. vivax, versus* os infectados. Os valores obtidos na análise da curva ROC para IgG, IgG1 e IgG3 anti-p314 foram detalhados na **Tabela 10**.

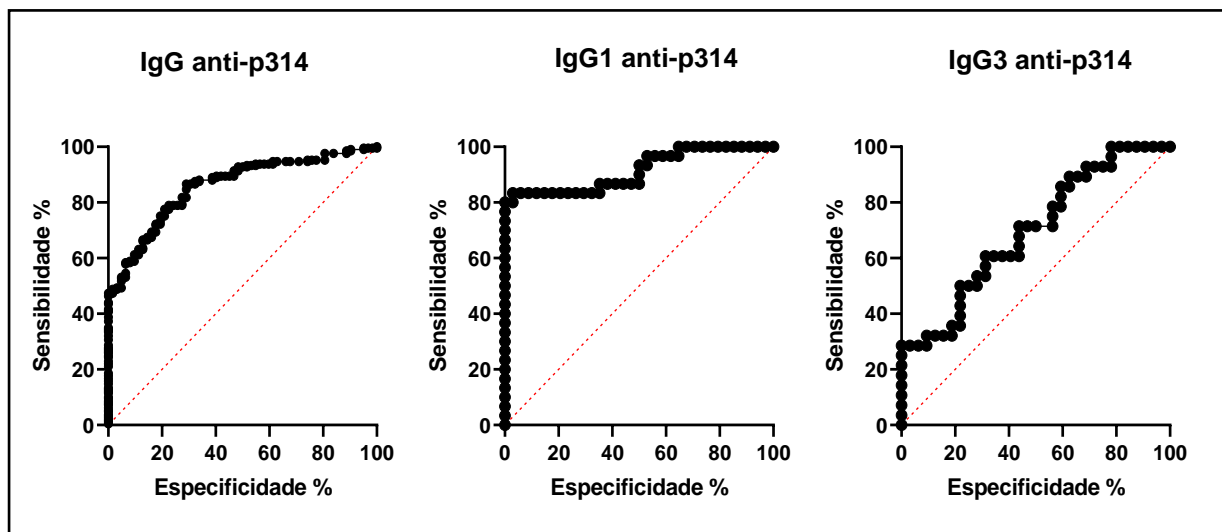


Figura 16: Curva ROC da resposta de IgG, IgG1 e IgG3 contra o peptídeo 314 da PvMSP-1. As curvas ROC foram montadas utilizando dados sorológicos de indivíduos infectados com *P. vivax* e indivíduos não infectados por *P. vivax* (infectados com *P. falciparum* e não infectados).

Tabela 10- Detalhamento dos valores obtidos na curva ROC

Plasmas não <i>vivax</i> versus <i>P. vivax</i>	Cut-off	Sensibilidade % (95% CI)	Especificidade % (95% CI)	Acurácia (área sob a curva ROC)	Valor p
IgG	> 0.6945	78,95 (72,92- 83,93)	77,42 (65,59- 86,04)	0,8578	<0,0001
IgG1	> 0.8999	83,33 (66,44- 92,66)	97,06 (85,08- 99,85)	0,9147	<0,0001
IgG3	> 0.9339	60,71 (42,41- 76,43)	59,38 (42,26- 74,48)	0,6942	<0,0099

6. DISCUSSÃO

A malária é uma doença infecciosa febril aguda que persiste como um grave problema de saúde pública no Brasil (Ministério da saúde, 2022), e no mundo (WHO, 2021). Apesar dos avanços recentes no controle da transmissão, nos últimos dois anos a pandemia de Covid-19 impactou as ações do Programa de Controle e como consequência o número de casos novos confirmados vem aumentando progressivamente (ROGERSON et al., 2020; WHO, 2021). Além disso, as taxas de morbidade e mortalidade por malária ainda são elevadas e se mantêm principalmente em países mais pobres, os quais se localizam no continente africano (NKUMAMA et al., 2017; WHO, 2021). Tendo milhões de pessoas sob risco de infecção em países tropicais e subtropicais, o desenvolvimento de novos métodos que possibilitem a confirmação da transmissão do parasito em dada área geográfica se fazem necessários, afim de tratar o mais rápido os possíveis reservatórios humanos e assim evitar a disseminação do plasmódio aos insetos vetores, bem como, melhorar o prognóstico dos pacientes expostos (ANDRADE & BARRAL-NETTO, 2011).

Plasmodium vivax, apesar de não ser considerada uma espécie letal, pode ocasionar manifestações clínicas graves (COSTA et al., 2011; COSTA et al., 2012; SINGH et al., 2011; QUISPE et al., 2014; RECHT et al., 2017; ADAMS et al., 2017). Além disso, é a espécie de plasmódio humano mais amplamente distribuída no mundo e a mais prevalente no Brasil (WHO, 2021; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022) e para a confirmação dos casos e tratamento adequado é imprescindível o diagnóstico específico para esta espécie de parasito (MUKKALA et al., 2018; AGARWAL et al., 2020). Características biológicas fazem com que o controle de *P. vivax* seja mais complexo e dificultado quando comparado a *P. falciparum*. Pode-se elencar como desafios os hipnozoítos intra-hepáticos dormentes, os casos assintomáticos ou indetectáveis e a maturação precoce de gametócitos que permitem com que *P. vivax* seja mais facilmente transmitido ao vetor e com que os reservatórios humanos não sejam identificados com facilidade (ADEKUNLE et al., 2015; MOREIRA et al., 2015; COMMONS et al., 2020).

Com o intuito de contribuir para o desenvolvimento de biomarcadores sorológicos que possam ser utilizados para delimitar áreas de transmissão, o presente estudo avaliou a resposta de anticorpos IgM, IgG e subclasses de IgG contra o peptídeo sintético 314, derivado da PvMSP-1, nos plasmas de pacientes infectados por *P. vivax*, pacientes infectados por *P. falciparum* e indivíduos não infectados. A escolha de trabalhar com este

peptídeo é justificada com base no estudo anterior realizado pelo nosso grupo, no qual pela técnica de *spot-synthesis*, peptídeos overlapping representando toda a sequência da PvMSP-1 foram acopladas à uma membrana de nitrocelulose e, por mapeamento de epítomos, o p314 foi selecionado por ser reconhecido exclusivamente por um pool de plasmas de pacientes com malária vivax (OLIVEIRA, 2013).

Reforçando o potencial uso do peptídeo p314 como marcador de exposição ao *P. vivax*, constatamos que a sequência de aminoácidos está presente apenas em merozoítos de *P. vivax*. Como a MSP-1 está presente em ambas as espécies de *Plasmodium* que ocorrem no Brasil, e a sequência do peptídeo de interesse localiza-se em um bloco conservado desta proteína (DEL PORTILLO et al., 1991; PUTAPORNTIP et al., 2002), decidiu-se verificar a similaridade do peptídeo com as sequências depositadas na National Library of Medicine, utilizando a ferramenta *online* BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*). O resultado desta análise revelou que *P. falciparum* não apresenta a mesma sequência de aminoácidos, o que justifica a baixa resposta de anticorpos observada em plasmas de indivíduos infectados por esta espécie. Além disso, o alinhamento da sequência deste peptídeo com outros organismos evidenciou uma similaridade abaixo de 40%, o que nos incentivou a avaliar o potencial desta molécula como marcador de exposição ao *P. vivax*.

Porções altamente imunogênicas como o fragmento C-terminal de 19 kDa denominado PvMSP-1₁₉, é capaz de induzir a produção de anticorpos que bloqueiam a invasão das hemácias (BRAGA et al., 1998; EGAN et al., 1999; CHANDRAMOHANADAS et al., 2014), assim como anticorpos protetores (LADEIA-ANDRADE et al., 2007; MCCAFFERY et al., 2019). Em análises de predição de células B *in silico*, pelo software BepiPred 2.0, foi verificado que o p314 avaliado neste estudo, apresenta regiões com alta predisposição para ligação de receptores de células B, o que leva ao desenvolvimento da imunidade adquirida e consequente produção de anticorpos (LADEIA-ANDRADE et al., 2007; MCCAFFERY et al., 2019). Esta elevada imunogenicidade associada ao fato de o peptídeo de interesse estar localizado no bloco 7 (OLIVEIRA, 2013), uma porção conservada da proteína, torna ainda mais promissor o seu uso como biomarcador, uma vez que cepas distintas de *P. vivax* poderiam desencadear a produção desses anticorpos.

Anticorpos IgM protetores e específicos contra bactérias, vírus e patógenos eucarióticos são identificados tanto em roedores como em humanos (ALUGUPALLI et al., 2003; COUPER et al., 2005; KATO et al., 2015 ; BOYLE et al., 2019; SHEN et al., 2019). Ao contrário do que é frequentemente documentado para outros antígenos, neste estudo os níveis de IgM anti-p314 não diferiram entre os grupos infectado e não infectado. Além disso, ao avaliar plasmas de pacientes em acompanhamento foi constatado que esses anticorpos são rapidamente estimulados com a presença do parasito e seus níveis não decaem com o passar de dois meses após a administração do tratamento para malária vivax. Fato que já foi previamente observado com o estímulo de outras moléculas em estudos com *P. falciparum* e *P. vivax* (BOYLE et al., 2019; MEDEIROS et al., 2020) e pode estar relacionado com a capacidade do parasito de alterar os perfis de células B periféricas, induzindo a ativação de células B de memória capazes de manter altas taxas de IgM específicos ou não, que duram para além da recuperação (PATGAONKAR et al., 2018; PIETRZAK et al., 2020; HOPP et al., 2021; THOUVENEL et al., 2021). Recentemente tem sido demonstrado que durante o desenvolvimento de *P. vivax* no hospedeiro vertebrado, uma biomassa considerável de parasitos é formada em nichos eritroblásticos localizados na medula óssea e no baço (BARBER et al., 2015; SILVA-FILHO et al., 2020; KHO et al., 2021). Nesse sentido, a persistência de anticorpos IgM em pacientes com infecção ativa por *P. vivax* pode ter associação com a presença do ciclo extra eritrocítico ocasionado por essa espécie, estimulando assim, uma constante ativação da resposta imune com a manutenção dos níveis de IgM em pacientes infectados.

Ao avaliar os anticorpos IgG contra o peptídeo estudado, verificou-se que os níveis foram significativamente maiores nos plasmas de pacientes infectados por *P. vivax* do que em pacientes infectados com *P. falciparum* e em indivíduos não infectados. Contudo apesar da diferença estatística nítida, não se pode considerar os anticorpos IgG totais como biomarcadores de exposição por *P. vivax*, uma vez que indivíduos não infectados e nunca expostos a malária tiveram uma resposta representativa desses anticorpos, bem como indivíduos infectados que tiveram pouca resposta de anticorpos contra o peptídeo. Além disso, a análise da curva ROC revelou uma sensibilidade e especificidade relativa desses anticorpos em diferenciar plasmas de indivíduos não infectados daqueles infectados com *P. vivax* e a correlação com a parasitemia não foi alta. Embora diversos estudos reforcem a possibilidade de uso dos anticorpos IgG totais como biomarcadores de infecção ou exposição para outros alvos anti-*Plasmodium* (UBILLOS et al., 2018;

LABADIE-BRACHO et al., 2020; KYEI-BAAFOUR et al., 2021; LONGLEY et al., 2021a; VILLASIS et al., 2021), nesta investigação nossos dados não sustentaram essa possibilidade. Ainda, não é bem compreendido o motivo dos pacientes não infectados e nunca expostos ao parasito apresentarem anticorpos específicos anti-*P. vivax*.

Com relação a avaliação dos plasmas de pacientes em acompanhamento, foi certificado que os anticorpos IgG anti-p314 não decaem de forma significativa após dois meses do tratamento, dado este que contrapõe alguns estudos de malária, os quais mostram que esses anticorpos contra outros alvos moleculares de *Plasmodium* não são sustentados com o passar do tempo (MEDEIROS et al., 2020; WALKER et al., 2020). No entanto, os resultados obtidos com as amostras de pacientes em acompanhamento, foram analisados com cautela, visto que o número de doadores em acompanhamento neste estudo é baixo, podendo ter pouco reflexo da realidade dos pacientes infectados com *P. vivax* no Brasil. Apesar de tais resultados, vale destacar a importância de se desenvolver metodologias capazes de detectar indivíduos infectados com *P. vivax* que são clinicamente assintomáticos ou indetectáveis pelos exames convencionais ou portam o parasito no estado intra-hepático silencioso (LONGLEY et al., 2017; LONGLEY et al., 2020; LONGLEY et al., 2021; LONGLEY et al., 2022). Dessa forma justificou-se a continuação da investigação de anticorpos específicos contra *P. vivax*, potenciais marcadores de exposição e infecção que eventualmente, poderiam contribuir para sanar esta lacuna.

Verificou-se a viabilidade das subclasses de IgG anti-p314 como marcadores sorológicos, uma vez que as mesmas podem representar alvos interessantes no que diz respeito às doenças infecciosas, já que são mais específicas e constituem-se importantes componentes da resposta imune efetiva (LUO et al., 2021; ROCA et al., 2021; SSEWANYANA et al., 2021). As subclasses IgG1–IgG4 apresentam diferenças na porção Fc, o que afeta a afinidade de ligação com as variantes dos receptores Fc, influenciando na função efetora, longevidade e capacidade de cruzar a barreira placentária (VIDARSSON et al., 2014; VALENZUELA & SCHAUB, 2018). A partir dos resultados alcançados com as subclasses de IgG anti-p314, tornou-se perceptível que dentre elas a mais promissora como biomarcador de exposição a *P. vivax* foi a IgG1, algo já previsto com outras moléculas (BRAGA et al., 2002; MORAIS et al., 2005; OYONG et al., 2019; SSEWANYANA et al., 2021; TAYIPTO et al., 2022). Além desses anticorpos estarem significativamente mais altos em plasmas de indivíduos infectados com *P. vivax*, ao

analisar a curva ROC foi observado alta sensibilidade e especificidade na diferenciação dos grupos experimentais, o que torna essa subclasse um alvo favorável a ser utilizado em estudos soroepidemiológicos. É importante ressaltar a importância de se realizar uma avaliação mais refinada com as subclasses de IgG, uma vez que com o IgG total os resultados não se mostraram relevantes, contudo, ao restringir a análise para anticorpos mais específicos diferenças promissoras foram alcançadas.

A partir desse achado, e sabendo que certas subclasses se esgotam na circulação na ausência do estímulo antigênico específico, intentamos definir quais delas não seriam detectadas 2 meses após a doença, afim de propor subclasses anti-p314 que poderiam ser utilizadas como indicadores de exposição recente. Nesse sentido, IgG3 anti-p314 se destacou, visto que em análises estatísticas apresentou diferença com queda de seus níveis após dois meses de infecção. Resultados semelhantes já foram relatados com anticorpos IgG3 contra outros antígenos de *P. falciparum* e *P. vivax* (MEHRIZI et al., 2009; BERRY et al., 2019; SSEWANYANA et al., 2021; TAYIPTO et al., 2022). Já os anticorpos IgG1 séricos são geralmente mais duradouros que as demais subclasses (MORAIS et al., 2005; MEHRIZI et al., 2009; BHATTACHARYYA et al., 2014; HE et al., 2019), os resultados expressos neste trabalho vão de encontro com esse parâmetro. Diferente de um estudo anterior que destaca a subclasse IgG4 contra antígenos brutos de *P. falciparum* como preditor de infecção placentária (ANCHANG-KIMBI et al., 2016), aqui os níveis dessas imunoglobulinas específicas contra o peptídeo foram baixos e esses anticorpos não se apresentaram como marcadores de infecção ou exposição, assim como IgG2.

Diante dos resultados alcançados, e tendo em vista que um dos principais desafios na região endêmica de malária no Brasil é a disponibilidade de doadores de sangue não infectados por *Plasmodium* spp. (WHO, 2010; WHO, 2012), a triagem desses doadores é uma prática fortemente recomendada, uma vez que o parasito pode ser transmitido via transfusão sanguínea (FREIMANIS et al., 2013). Embora o exame por microscopia de luz possa ser realizado para rastrear a infecção, esta metodologia apresenta baixa sensibilidade e especificidade principalmente para *P. vivax*, o que compromete diretamente a detecção do parasito (KITCHEN & CHIODINI, 2006; OWUSU-OFORI et al., 2013). Estudos recentes propõe a utilização de kits de ELISA (VAN DE HOOGEN et al., 2020), assim como testes moleculares para a triagem em bancos de sangue na tentativa de evitar essa forma de transmissão (ROCHA et al., 2020). Nesse sentido, os anticorpos contra o peptídeo 314 avaliados neste estudo, apresentam-se como uma

possível alternativa para contribuir na identificação de pacientes previamente expostos ou mesmo infectados com o parasito, uma vez que em nossas análises os anticorpos IgG1 anti-p314 foram detectados com altos níveis em plasmas de pacientes infectados por *P. vivax*, e baixos níveis em plasmas de pacientes infectados por *P. falciparum* e indivíduos não infectados. Portanto, este pode constituir um potencial marcador sorológico para detectar pacientes que foram expostos a infecção nos bancos de sangue. Associado a ele, IgG3 anti-p314 pode ser incorporado na tentativa de avaliar se a exposição foi mais recente ou tardia.

Além disso, IgG1 anti-p314 consiste em um alvo promissor para estudos soropidemiológicos que visem a delimitação de áreas de ocorrência de *P. vivax*, bem como determinar a sua prevalência em uma dada região, seja ela endêmica ou não (FOLEGATTI et al., 2017; LONGLEY et al., 2017; LONGLEY et al., 2021; LONGLEY et al., 2022; TAYIPTO et al., 2022). Mensurar a ocorrência de malária assume relevância visto que o aumento do número de casos acima do esperado para cada semana epidemiológica, em um dado local e por um período de tempo determinado, é caracterizado como um surto. A análise dos surtos é especialmente importante em municípios de baixo e muito baixo risco de transmissão malárica, pois a falta de ações de resposta e controle nesses municípios, pode comprometer o avanço de eliminação da doença alcançado nos últimos anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Em 2021, na região amazônica, foram registrados 1.742 surtos em 126 municípios diferentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Nos estados do Mato Grosso, Amazonas e Pará, aumentaram os registros de surtos em municípios de muito baixo risco, o que exige atenção e ações de repostas oportunas por parte da vigilância epidemiológica local (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Já em estados da região extra-amazônica, a identificação dos surtos geralmente é demorada, devido ao atraso na busca do atendimento médico, os sintomas inespecíficos e a falta de experiência por parte dos profissionais de saúde com o diagnóstico clínico e laboratorial. Fato que faz com que os casos extra-amazônicos sejam mais graves e letais (DA SILVA-NUNAS et al., 2008; DA SILVA-NUNES et al., 2008; DE PINA-COSTA et al., 2018; GARCIA et al., 2022; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Entre 2016 e 2017 foi registrado um surto de malária em Minas Gerais, na região do Vale do Jequitinhonha, que contou com 23 casos relatados. A maior parte dos afetados

eram homens que trabalhavam na região com a prática do garimpo, e a espécie responsável pela infecção foi o *P. vivax*. Todos os pacientes receberam o esquema terapêutico de Cloroquina + Primaquina, e dois deles tiveram recidiva. Acredita-se que esse evento teve origem a partir de um caso importado da área endêmica (ANJOS-SILVA et al., 2021). Em 2018, a Secretaria de Estado de Saúde do Espírito Santo (SES-ES) notificou 112 casos de malária no estado, com uma morte confirmada. Na época a prefeitura de Vila Pavão (área mais afetada pelo surto) decretou situação de emergência de saúde e a suspeita de origem foi a partir de um caso importado de área endêmica (SES-ES, 2018). Vale ressaltar que o Espírito Santo é um dos estados da região extra-amazônica que mais registra casos autóctones de malária, em fragmentos de Mata atlântica, e entre 2011 e 2020 foram verificados 7309 casos havendo internações e óbitos (SES-ES, 2021). E recentemente, em 2021, foi registrado no sul da Bahia mais um surto de malária que contou com 53 casos positivos. Especialistas atribuíram o motivo do surto a um caso importado de Manaus (MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DA BAHIA, 2021). Esses eventos inesperados e alarmantes, devido ao potencial de gravidade da infecção, reforçam a importância da vigilância epidemiológica para a adoção imediata de ações para o controle.

Por meio deste trabalho, foi possível demonstrar que anticorpos IgG1 e IgG3 contra o p314 podem ser utilizados como biomarcadores de exposição ao *P. vivax*. Logo, a busca destes anticorpos específicos pode ser uma medida implementada em estudos soropidemiológicos que visem a caracterização da transmissão em áreas de baixa e alta prevalência e a identificação de fontes silenciosas de infecção. Além disso, torna-se factível a possibilidade de prever, assim como estimar a periodicidade de surtos epidêmicos de malária causados por *P. vivax* em diferentes cenários de ocorrência da espécie. Assim, o uso da vigilância epidemiológica associada a implementação de medidas de controle como o diagnóstico rápido, preciso e tratamento adequado se fazem essenciais para eliminação da infecção causada pelo *P. vivax* (GIL et al., 2007; GREENWOOD et al., 2008; KIM et al., 2014; O'FLAHERTY et al., 2022).

7. CONCLUSÕES

Os níveis de IgG específicos para o p314, apesar de apresentarem resultados significativos, não podem ser utilizados como marcadores de exposição;

IgG1 anti-p314 se apresentou como marcador sorológico de exposição a *P. vivax*, logo pode ser uma subclasse promissora para estudos epidemiológicos;

Apenas IgG3 anti-p314 apresentou queda significativa nos níveis entre o dia 0 e o dia 63 após o diagnóstico, portanto pode ser utilizado em associação com o IgG1 para verificação de exposições recentes a *P. vivax*.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS JH, MUELLER I. The Biology of *Plasmodium vivax*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017 Sep 1;7(9):a025585. doi: 10.1101/cshperspect.a025585. PMID: 28490540; PMCID: PMC5580510.

ADEKUNLE AI, PINKEVYCH M, MCGREADY R, LUXEMBURGER C, WHITE LJ, NOSTEN F, CROMER D, DAVENPORT MP. Modeling the dynamics of *Plasmodium vivax* infection and hypnozoite reactivation in vivo. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Mar 17;9(3):e0003595. doi: 10.1371/journal.pntd.0003595. PMID: 25780913; PMCID: PMC4364305.

AGARWAL R, CHOI L, JOHNSON S, TAKWOINGI Y. Rapid diagnostic tests for *Plasmodium vivax* malaria in endemic countries. Cochrane Database Syst Rev. 2020 Nov 4;11(11):CD013218. doi: 10.1002/14651858.CD013218.pub2. PMID: 33146932; PMCID: PMC8078698.

AKIMOVA T, BEIER UH, WANG L, LEVINE MH, HANCOCK WW. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. PLoS One. 2011;6(8):e24226. doi: 10.1371/journal.pone.0024226. Epub 2011 Aug 30. PMID: 21918685; PMCID: PMC3168881.

ALUGUPALLI KR, GERSTEIN RM, CHEN J, SZOMOLANYI-TSUDA E, WOODLAND RT, LEONG JM. The resolution of relapsing fever borreliosis requires IgM and is concurrent with expansion of B1b lymphocytes. J Immunol. 2003 Apr 1;170(7):3819-27. doi: 10.4049/jimmunol.170.7.3819. PMID: 12646649.

ALVES FP, DURLACHER RR, MENEZES MJ, KRIEGER H, SILVA LH, CAMARGO EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. Am J Trop Med Hyg. 2002 Jun;66(6):641-8. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.641. PMID: 12224567.

AMINO R, THIBERGE S, MARTIN B, CELLI S, SHORTE S, FRISCHKNECHT F, MÉNARD R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. Nat Med. 2006 Feb;12(2):220-4. doi: 10.1038/nm1350. Epub 2006 Jan 22. PMID: 16429144.

ANCHANG-KIMBI JK, ACHIDI EA, NKEGOUM B, MENDIMI JN, SVERREMARK-EKSTRÖM E, TROYE-BLOMBERG M. IgG isotypic antibodies to crude *Plasmodium falciparum* blood-stage antigen associated with placental malaria infection in parturient Cameroonian women. Afr Health Sci. 2016 Dec;16(4):1007-1017. doi: 10.4314/ahs.v16i4.17. PMID: 28479893; PMCID: PMC5398447.

ANDRADE BB, BARRAL-NETTO M. Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011 Aug;106 Suppl 1:70-8. doi: 10.1590/s0074-02762011000900009. PMID: 21881759.

ANJOS-SILVA, J. T., Dória, D. A. N., Rosário, S. S., Sanchez, B. A. M., & Barata, R. A. Surto de malária em área de mineração situada no Vale do Rio Jequitinhonha, Estado de Minas Gerais: Malaria outbreak in a mining area located in the Jequitinhonha River Valley, State of Minas Gerais. *Health and Biosciences*, v. 2, n. 2, p. 29-37, 2021.

ANTONELLI LR, JUNQUEIRA C, VINETZ JM, GOLENBOCK DT, FERREIRA MU, GAZZINELLI RT. The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. *Immunol Rev*. 2020 Jan;293(1):163-189. doi: 10.1111/imr.12816. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31642531.

ANTONELLI LR, LEORATTI FM, COSTA PA, ROCHA BC, DINIZ SQ, TADA MS, PEREIRA DB, TEIXEIRA-CARVALHO A, GOLENBOCK DT, GONÇALVES R, GAZZINELLI RT. The CD14+CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Pathog*. 2014 Sep 18;10(9):e1004393. doi: 10.1371/journal.ppat.1004393. PMID: 25233271; PMCID: PMC4169496.

ARTAVANIS-TSAKONAS K, TONGREN JE, RILEY EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol*. 2003 Aug;133(2):145-52. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2003.02174.x. PMID: 12869017; PMCID: PMC1808775.

ASHLEY EA, PYAE PHYO A, WOODROW CJ. Malaria. *Lancet*. 2018 Apr 21;391(10130):1608-1621. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30324-6. Epub 2018 Apr 6. PMID: 29631781.

BABON JJ, MORGAN WD, KELLY G, ECCLESTON JF, FEENEY J, HOLDER AA. Structural studies on *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1. *Mol Biochem Parasitol*. 2007 May;153(1):31-40. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.01.015. Epub 2007 Jan 30. PMID: 17343930.

BAER K, KLOTZ C, KAPPE SH, SCHNIEDER T, FREVERT U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog*. 2007 Nov;3(11):e171. doi: 10.1371/journal.ppat.0030171. PMID: 17997605; PMCID: PMC2065874.

BAIA-DA-SILVA DC, BRITO-SOUSA JD, RODOVALHO SR, PETERKA C, MORESCO G, LAPOUBLE OMM, MELO GC, SAMPAIO VS, ALECRIM MDGC, PIMENTA P, LIMA JBP, LACERDA MVG, MONTEIRO WM. Current vector control challenges in the fight against malaria in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019 Mar 7;52:e20180542. doi: 10.1590/0037-8682-0542-2018. PMID: 30843971.

BARBER BE, WILLIAM T, GRIGG MJ, PARAMESWARAN U, PIERA KA, PRICE RN, YEO TW, ANSTEY NM. Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction and disease severity in vivax malaria. *PLoS Pathog*. 2015 Jan 8;11(1):e1004558. doi: 10.1371/journal.ppat.1004558. PMID: 25569250; PMCID: PMC4287532.

BERRY AA, GOTTLIEB ER, KOURIBA B, DIARRA I, THERA MA, DUTTA S, COULIBALY D, OUATTARA A, NIANGALY A, KONE AK, TRAORE K, TOLO Y, MISHCHERKIN V, SOISSON L, DIGGS CL, et al. Immunoglobulin G subclass and antibody avidity responses in Malian children immunized with *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 vaccine candidate FMP2.1/AS02_A. *Malar J*. 2019 Jan 18;18(1):13. doi: 10.1186/s12936-019-2637-x. PMID: 30658710; PMCID: PMC6339315.

BESTEIRO S, DUBREMETZ JF, LEBRUN M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cell Microbiol*. 2011 Jun;13(6):797-805. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x. Epub 2011 Apr 28. PMID: 21535344.

BHATTACHARYYA T, AYANDEH A, FALCONAR AK, SUNDAR S, EL-SAFI S, GRIPENBERG MA, BOWES DE, THUNISSEN C, SINGH OP, KUMAR R, AHMED O, EISA O, SAAD A, SILVA PEREIRA S, BOELAERT M, MERTENS P, MILES MA. IgG1 as a potential biomarker of post-chemotherapeutic relapse in visceral leishmaniasis, and adaptation to a rapid diagnostic test. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Oct 23;8(10):e3273. doi: 10.1371/journal.pntd.0003273. PMID: 25340782; PMCID: PMC4207679.

BLACKMAN MJ, HEIDRICH HG, DONACHIE S, MCBRIDE JS, HOLDER AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med*. 1990 Jul 1;172(1):379-82. doi: 10.1084/jem.172.1.379. PMID: 1694225; PMCID: PMC2188181.

BLACKMAN MJ. Purification of *Plasmodium falciparum* merozoites for analysis of the processing of merozoite surface protein-1. *Methods Cell Biol*. 1994;45:213-20. doi: 10.1016/s0091-679x(08)61853-1. PMID: 7707987.

BOYLE MJ, CHAN JA, HANDAYUNI I, REILING L, FENG G, HILTON A, KURTOVIC L, OYONG D, PIERA KA, BARBER BE, WILLIAM T, EISEN DP, MINIGO G, LANGER C, DREW DR, DE LABASTIDA RIVERA F, et al. IgM in human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Sci Adv*. 2019 Sep 25;5(9):eaax4489. doi: 10.1126/sciadv.aax4489. PMID: 31579826; PMCID: PMC6760923.

BOYLE MJ, REILING L, FENG G, LANGER C, OSIER FH, ASPELING-JONES H, CHENG YS, STUBBS J, TETTEH KK, CONWAY DJ, MCCARTHY JS, MULLER I, MARSH K, ANDERS RF, BEESON JG. Human antibodies fix complement to inhibit *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. *Immunity*. 2015 Mar 17;42(3):580-90. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.012. PMID: 25786180; PMCID: PMC4372259.

BRAGA EM, BARROS RM, REIS TA, FONTES CJ, MORAIS CG, MARTINS MS, KRETTLI AU. Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 May;66(5):461-6. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.461. PMID: 12201577.

BRAGA EM, FONTES CJ, KRETTLI AU. Persistence of humoral response against sporozoite and blood-stage malaria antigens 7 years after a brief exposure to *Plasmodium vivax*. J Infect Dis. 1998 Apr;177(4):1132-5. doi: 10.1086/517412. PMID: 9535000.

BRASIL P, ZALIS MG, DE PINA-COSTA A, SIQUEIRA AM, JÚNIOR CB, SILVA S, AREAS ALL, PELAJO-MACHADO M, DE ALVARENGA DAM, DA SILVA SANTELLI ACF, ALBUQUERQUE HG, CRAVO P, SANTOS DE ABREU FV, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. Lancet Glob Health. 2017 Oct;5(10):e1038-e1046. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30333-9. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28867401.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. Boletim epidemiológico- Malária. 2022. Disponível > www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria

BUENO LL, FUJIWARA RT, SOARES IS, BRAGA EM. Direct effect of *Plasmodium vivax* recombinant vaccine candidates AMA-1 and MSP-119 on the innate immune response. Vaccine. 2008 Feb 26;26(9):1204-13. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.12.031. Epub 2008 Jan 14. PMID: 18242795.

CARDOSO-OLIVEIRA, Peptídeo sintético derivado da proteína 1 da superfície de merozoíto de *Plasmodium vivax* (PvMSP-1) como potencial biomarcador de malária vivax. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2019.

CARLTON JM, SINA BJ, ADAMS JH. Why is *Plasmodium vivax* a neglected tropical disease? PLoS Negl Trop Dis. 2011 Jun;5(6):e1160. doi: 10.1371/journal.pntd.0001160. Epub 2011 Jun 28. PMID: 21738804; PMCID: PMC3125139.

CARROLO M, GIORDANO S, CABRITA-SANTOS L, CORSO S, VIGÁRIO AM, SILVA S, LEIRIÃO P, CARAPAU D, ARMAS-PORTELA R, COMOGLIO PM, RODRIGUEZ A, MOTA MM. Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. Nat Med. 2003 Nov;9(11):1363-9. doi: 10.1038/nm947. Epub 2003 Oct 12. PMID: 14556002.

CASTRO-GOMES T, MOURÃO LC, MELO GC, MONTEIRO WM, LACERDA MV, BRAGA ÉM. Potential immune mechanisms associated with anemia in *Plasmodium vivax* malaria: a puzzling question. Infect Immun. 2014 Oct;82(10):3990-4000. doi: 10.1128/IAI.01972-14. Epub 2014 Aug 4. Erratum in: Infect Immun. 2014 Dec;82(12):5346. PMID: 25092911; PMCID: PMC4187874.

CERÁVOLO IP, BRUÑA-ROMERO O, BRAGA EM, FONTES CJ, BRITO CF, SOUZA JM, KRETTLI AU, ADAMS JH, CARVALHO LH. Anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. Am J Trop Med Hyg. 2005 Jun;72(6):675-81. PMID: 15964949.

CHANDRAMOHANADAS R, BASAPPA, RUSSELL B, LIEW K, YAU YH, CHONG A, LIU M, GUNALAN K, RAMAN R, RENIA L, NOSTEN F, SHOCHAT SG, DAO M, SASISEKHARAN R, SURESH S, PREISER P. Small molecule targeting malaria merozoite surface protein-1 (MSP-1) prevents host invasion of divergent plasmodial species. *J Infect Dis.* 2014 Nov 15;210(10):1616-26. doi: 10.1093/infdis/jiu296. Epub 2014 May 26. PMID: 24864124; PMCID: PMC4334792.

CHANGROB S, MCHENRY AM, NYUNT MH, SATTABONGKOT J, HAN ET, ADAMS JH, CHOOTONG P. Persistence of Long-lived Memory B Cells specific to Duffy Binding Protein in individuals exposed to *Plasmodium vivax*. *Sci Rep.* 2018 May 29;8(1):8347. doi: 10.1038/s41598-018-26677-x. PMID: 29844379; PMCID: PMC5973932.

CHEN N, AULIFF A, RIECKMANN K, GATTON M, CHENG Q. Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. *J Infect Dis.* 2007 Apr 1;195(7):934-41. doi: 10.1086/512242. Epub 2007 Feb 26. PMID: 17330782.

COCKBURN IA, SEDER RA. Malaria prevention: from immunological concepts to effective vaccines and protective antibodies. *Nat Immunol.* 2018 Nov;19(11):1199-1211. doi: 10.1038/s41590-018-0228-6. Epub 2018 Oct 17. PMID: 30333613.

COHEN S, MCGREGOR IA, CARRINGTON S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature.* 1961 Nov 25;192:733-7. doi: 10.1038/192733a0. PMID: 13880318.

COMMONS R.J., SIMPSON J.A., WATSON J., WHITE N.J., PRICE R.N. Estimating the proportion of *Plasmodium vivax* recurrences caused by relapse: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2020;103:1094–1099. doi: 10.4269/ajtmh.20-0186.

COSTA EMF, AMADOR ECC, SILVA ES, ALVARENGA CO, PEREIRA PE, PÓVOA MM, CUNHA MG. Malaria transmission and individual variability of the naturally acquired IgG antibody against the *Plasmodium vivax* blood-stage antigen in an endemic area in Brazil. *Acta Trop.* 2020 Sep;209:105537. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105537. Epub 2020 May 23. PMID: 32454033.

COSTA FT, LOPES SC, ALBRECHT L, ATAÍDE R, SIQUEIRA AM, SOUZA RM, RUSSELL B, RENIA L, MARINHO CR, LACERDA MV. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. *Int J Parasitol.* 2012 Nov;42(12):1099-105. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.08.007. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23022617.

COSTA FT, LOPES SC, FERRER M, LEITE JA, MARTIN-JAULAR L, BERNABEU M, NOGUEIRA PA, MOURÃO MP, FERNANDEZ-BECERRA C, LACERDA MV, DEL PORTILLO H. On cytoadhesion of *Plasmodium vivax*: raison d'être? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 Aug;106 Suppl 1:79-84. doi: 10.1590/s0074-02762011000900010. PMID: 21881760.

COUPER KN, ROBERTS CW, BROMBACHER F, ALEXANDER J, JOHNSON LL. *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin M limits parasite dissemination by preventing host cell invasion. *Infect Immun*. 2005 Dec;73(12):8060-8. doi: 10.1128/IAI.73.12.8060-8068.2005. PMID: 16299300; PMCID: PMC1307022.

COWMAN AF, HEALER J, MARAPANA D, MARSH K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 2016 Oct 20;167(3):610-624. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.055. PMID: 27768886.

COX FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors*. 2010 Feb 1;3(1):5. DOI: 10.1186/1756-3305-3-5. PMID: 20205846; PMCID: PMC2825508.

COX-SINGH J, DAVIS TM, LEE KS, SHAMSUL SS, MATUSOP A, RATNAM S, RAHMAN HA, CONWAY DJ, SINGH B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*. 2008 Jan 15;46(2):165-71. DOI: 10.1086/524888. PMID: 18171245; PMCID: PMC2533694.

CUNHA MG, SILVA ES, SEPÚLVEDA N, COSTA SP, SABOIA TC, GUERREIRO JF, PÓVOA MM, CORRAN PH, RILEY E, DRAKELEY CJ. Serologically defined variations in malaria endemicity in Pará state, Brazil. *PLoS One*. 2014 Nov 24;9(11):e113357. doi: 10.1371/journal.pone.0113357. Erratum in: *PLoS One*. 2021 Nov 19;16(11):e0260513. PMID: 25419900; PMCID: PMC4242530.

CUTTS JC, POWELL R, AGIUS PA, BEESON JG, SIMPSON JA, FOWKES FJ. Immunological markers of *Plasmodium vivax* exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2014 Sep 9;12:150. doi: 10.1186/s12916-014-0150-1. PMID: 25199532; PMCID: PMC4172944.

DA SILVA-NUNES M, CODEÇO CT, MALAFRONTA RS, DA SILVA NS, JUNCANSEN C, MUNIZ PT, FERREIRA MU. Malaria on the Amazonian frontier: transmission dynamics, risk factors, spatial distribution, and prospects for control. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Oct;79(4):624-35. PMID: 18840755.

DA SILVA-NUNES M, MORENO M, CONN JE, GAMBOA D, ABELES S, VINETZ JM, FERREIRA MU. Amazonian malaria: asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. *Acta Trop*. 2012 Mar;121(3):281-91. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.10.001. Epub 2011 Oct 12. PMID: 22015425; PMCID: PMC3308722.

DAS S, HERTRICH N, PERRIN AJ, WITHERS-MARTINEZ C, COLLINS CR, JONES ML, WATERMEYER JM, FOBES ET, MARTIN SR, SAIBIL HR, WRIGHT GJ, TREECK M, EPP C, BLACKMAN MJ. Processing of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein MSP1 Activates a Spectrin-Binding Function Enabling Parasite Egress from RBCs. *Cell Host Microbe*. 2015 Oct 14;18(4):433-44. doi: 10.1016/j.chom.2015.09.007. PMID: 26468747; PMCID: PMC4608996.

DE ARAUJO FC, DE REZENDE AM, FONTES CJ, CARVALHO LH, ALVES DE BRITO CF. Multiple-clone activation of hypnozoites is the leading cause of relapse in *Plasmodium vivax* infection. PLoS One. 2012;7(11):e49871. doi: 10.1371/journal.pone.0049871. Epub 2012 Nov 21. PMID: 23185469; PMCID: PMC3503861.

DE LEMOS AB, DA SILVA OS, DEBONI SC, SCHALLEMBERGER V, DOS SANTOS E, DE ALMEIDA MAB, MARTH AAD, SILVA S, MELLO ARL, SILVA-DO-NASCIMENTO TF, FERREIRA-DA-CRUZ MF, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, CARDOSO JDC. Reemergence of human malaria in Atlantic Forest of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2021 Jul 12;116:e210064. doi: 10.1590/0074-02760210064. PMID: 34259737; PMCID: PMC8279121.

DE PINA-COSTA A, BRASIL P, DI SANTI SM, DE ARAUJO MP, SUÁREZ-MUTIS MC, SANTELLI AC, OLIVEIRA-FERREIRA J, LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R, DANIEL-RIBEIRO CT. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 Aug;109(5):618-33. DOI: 10.1590/0074-0276140228. Erratum in: Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018 Aug 27;113(9):e140228ER. PMID: 25185003; PMCID: PMC4156455.

DEL PORTILLO HA, LONGACRE S, KHOURI E, DAVID PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 May 1;88(9):4030-4. doi: 10.1073/pnas.88.9.4030. PMID: 2023952; PMCID: PMC51587.

DEMARI-SILVA B, LAPORTA GZ, OLIVEIRA T, SALLUM M. *Plasmodium* infection in *Kerteszia cruzii* (Diptera: Culicidae) in the Atlantic tropical rain forest, southeastern Brazil. Infect Genet Evol. 2020 Mar;78:104061. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104061. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31683005.

DUTTA S, KAUSHAL DC, WARE LA, PURI SK, KAUSHAL NA, NARULA A, UPADHYAYA DS, LANAR DE. Merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* induces a protective response against *Plasmodium cynomolgi* challenge in rhesus monkeys. Infect Immun. 2005 Sep;73(9):5936-44. doi: 10.1128/IAI.73.9.5936-5944.2005. PMID: 16113314; PMCID: PMC1231099.

EJIGIRI I, SINNIS P. Plasmodium sporozoite-host interactions from the dermis to the hepatocyte. Curr Opin Microbiol. 2009 Aug;12(4):401-7. doi: 10.1016/j.mib.2009.06.006. Epub 2009 Jul 14. PMID: 19608456; PMCID: PMC2725221.

FAIRHURST RM, WELLEMS TE. Modulation of malaria virulence by determinants of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 display. Curr Opin Hematol. 2006 May;13(3):124-30. doi: 10.1097/01.moh.0000219655.73162.42. PMID: 16567953.

FANÇONY C, BRITO M, Gil JP. *Plasmodium falciparum* drug resistance in Angola. Malar J. 2016 Feb 9;15:74. doi: 10.1186/s12936-016-1122-z. PMID: 26858018; PMCID: PMC4746923.

FERNANDEZ-BECERRA C, SANZ S, BRUCET M, STANISIC DI, ALVES FP, CAMARGO EP, ALONSO PL, MUELLER I, DEL PORTILLO HA. Naturally-acquired humoral immune responses against the N- and C-termini of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay. *Malar J*. 2010 Jan 21;9:29. doi: 10.1186/1475-2875-9-29. PMID: 20092651; PMCID: PMC2835717.

FERRANTE A, BEARD LJ, FELDMAN RG. IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J*. 1990 Aug;9(8 Suppl):S16-24. PMID: 2216603.

FIGUEIREDO MM, COSTA PAC, DINIZ SQ, HENRIQUES PM, KANO FS, TADA MS, PEREIRA DB, SOARES IS, MARTINS-FILHO OA, JANKOVIC D, GAZZINELLI RT, ANTONELLI LRDV. T follicular helper cells regulate the activation of B lymphocytes and antibody production during *Plasmodium vivax* infection. *PLoS Pathog*. 2017 Jul 10;13(7):e1006484. doi: 10.1371/journal.ppat.1006484. PMID: 28700710; PMCID: PMC5519210.

FOLEGATTI PM, SIQUEIRA AM, MONTEIRO WM, LACERDA MV, DRAKELEY CJ, BRAGA ÉM. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. *Malar J*. 2017 Mar 7;16(1):107. doi: 10.1186/s12936-017-1762-7. PMID: 28270152; PMCID: PMC5341168.

FRANK R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods*. 2002 Sep 1;267(1):13-26. doi: 10.1016/s0022-1759(02)00137-0. PMID: 12135797.

FREIMANIS G, SEDEGAH M, OWUSU-OFORI S, KUMAR S, ALLAIN JP. Investigating the prevalence of transfusion transmission of *Plasmodium* within a hyperendemic blood donation system. *Transfusion*. 2013 Jul;53(7):1429-41. doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03943.x. Epub 2012 Nov 1. PMID: 23113534.

GARCIA KKS, ABRAHÃO AA, OLIVEIRA AFM, HENRIQUES KMD, DE PINA-COSTA A, SIQUEIRA AM, RAMALHO WM. Malaria time series in the extra-Amazon region of Brazil: epidemiological scenario and a two-year prediction model. *Malar J*. 2022 May 31;21(1):157. DOI: 10.1186/s12936-022-04162-1. PMID: 35641976; PMCID: PMC9153870.

GAUSEPOHL H, BOULIN C, KRAFT M, FRANK RW. Automated multiple peptide synthesis. *Pept Res*. 1992 Nov-Dec;5(6):315-20. PMID: 1283542.

GAZZINELLI RT, KALANTARI P, FITZGERALD KA, GOLENBOCK DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol*. 2014 Nov;14(11):744-57. doi: 10.1038/nri3742. Epub 2014 Oct 17. PMID: 25324127.

GIL LH, TADA MS, KATSURAGAWA TH, RIBOLLA PE, DA SILVA LH. Urban and suburban malaria in Rondônia (Brazilian Western Amazon) II. Perennial transmissions

with high anopheline densities are associated with human environmental changes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007 Jun;102(3):271-6. DOI: 10.1590/s0074-02762007005000013. PMID: 17568931.

GRAEWE S, STANWAY RR, RENNENBERG A, HEUSSLER VT. Chronicle of a death foretold: *Plasmodium* liver stage parasites decide on the fate of the host cell. FEMS Microbiol Rev. 2012 Jan;36(1):111-30. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00297.x. Epub 2011 Aug 9. PMID: 22092244.

GREENWOOD BM, FIDOCK DA, KYLE DE, KAPPE SH, ALONSO PL, COLLINS FH, DUFFY PE. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. J Clin Invest. 2008 Apr;118(4):1266-76. doi: 10.1172/JCI33996. PMID: 18382739; PMCID: PMC2276780.

GREENWOOD BM. Control to elimination: implications for malaria research. Trends Parasitol. 2008 Oct;24(10):449-54. DOI: 10.1016/j.pt.2008.07.002. Epub 2008 Aug 27. PMID: 18760671.

GRIFFING SM, TAUIL PL, UDHAYAKUMAR V, SILVA-FLANNERY L. A historical perspective on malaria control in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 Sep;110(6):701-18. doi: 10.1590/0074-02760150041. PMID: 26517649; PMCID: PMC4667572.

HAGHI AM, KHORAMIZADE MR, NATEGHPOUR M, MOHEBALI M, EDRISSIAN GH, ESHRAGHIAN MR, SEPEHRIZADEH Z. A recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 to detect human infection in Iran. Korean J Parasitol. 2012 Mar;50(1):15-21. doi: 10.3347/kjp.2012.50.1.15. Epub 2012 Mar 6. PMID: 22451729; PMCID: PMC3309046.

HALDAR K, MURPHY SC, MILNER DA, TAYLOR TE. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. Annu Rev Pathol. 2007;2:217-49. DOI: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.091913. PMID: 18039099.

HARRIS I, SHARROCK WW, BAIN LM, GRAY KA, BOBOGARE A, BOAZ L, LILLEY K, KRAUSE D, VALLELY A, JOHNSON ML, GATTON ML, SHANKS GD, CHENG Q. A large proportion of asymptomatic *Plasmodium* infections with low and sub-microscopic parasite densities in the low transmission setting of Temotu Province, Solomon Islands: challenges for malaria diagnostics in an elimination setting. Malar J. 2010 Sep 7;9:254. doi: 10.1186/1475-2875-9-254. PMID: 20822506; PMCID: PMC2944341.

HE WQ, SHAKRI AR, BHARDWAJ R, FRANÇA CT, STANISIC DI, HEALER J, KINIBORO B, ROBINSON LJ, GUILLOTTE-BLISNICK M, HUON C, SIBA P, COWMAN A, KING CL, THAM WH, CHITNIS CE, MUELLER I. Antibody responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding and Erythrocyte binding proteins predict risk of infection and are associated with protection from clinical Malaria. PLoS Negl Trop Dis. 2019 Feb 15;13(2):e0006987. doi: 10.1371/journal.pntd.0006987. PMID: 30768655; PMCID: PMC6400399.

HERRERA R, ANDERSON C, KUMAR K, MOLINA-CRUZ A, NGUYEN V, BURKHARDT M, REITER K, SHIMP R JR, HOWARD RF, SRINIVASAN P, NOLD MJ, RAGHEB D, SHI L, DECOTIIS M, AEBIG J, et al. Reversible Conformational Change in the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein Masks Its Adhesion Domains. *Infect Immun*. 2015 Oct;83(10):3771-80. doi: 10.1128/IAI.02676-14. Epub 2015 Jul 13. PMID: 26169272; PMCID: PMC4567636.

HOLDER AA, BLACKMAN MJ, BORRE M, BURGHAUS PA, CHAPPEL JA, KEEN JK, LING IT, OGUN SA, OWEN CA, SINHA KA. Malaria parasites and erythrocyte invasion. *Biochem Soc Trans*. 1994 May;22(2):291-5. doi: 10.1042/bst0220291. PMID: 7958309.

HOLDER AA, BLACKMAN MJ, BURGHAUS PA, CHAPPEL JA, LING IT, MCCALLUM-DEIGHTON N, SHAI S. A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87 Suppl 3:37-42. doi: 10.1590/s0074-02761992000700004. PMID: 1343716.

HOPP CS, SEKAR P, DIOUF A, MIURA K, BOSWELL K, SKINNER J, TIPTON CM, PETERSON ME, CHAMBERS MJ, ANDREWS S, LU J, TAN J, LI S, DOUMBO S, KAYENTAO K, ONGOIBA A, et al. *Plasmodium falciparum*-specific IgM B cells dominate in children, expand with malaria, and produce functional IgM. *J Exp Med*. 2021 Apr 5;218(4):e20200901. doi: 10.1084/jem.20200901. PMID: 33661303; PMCID: PMC7938365.

HORTA MF, ANDRADE LO, MARTINS-DUARTE ÉS, CASTRO-GOMES T. Cell invasion by intracellular parasites - the many roads to infection. *J Cell Sci*. 2020 Feb 20;133(4):jcs232488. doi: 10.1242/jcs.232488. PMID: 32079731.

HULDÉN L, HULDÉN L, HELIÖVAARA K. Natural relapses in vivax malaria induced by *Anopheles* mosquitoes. *Malar J*. 2008 Apr 22;7:64. doi: 10.1186/1475-2875-7-64. PMID: 18430203; PMCID: PMC2374798.

IRANI V, GUY AJ, ANDREW D, BEESON JG, RAMSLAND PA, RICHARDS JS. Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Mol Immunol*. 2015 Oct;67(2 Pt A):171-82. doi: 10.1016/j.molimm.2015.03.255. Epub 2015 Apr 18. PMID: 25900877.

ISHINO T, CHINZEI Y, YUDA M. Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. *Mol Microbiol*. 2005 Dec;58(5):1264-75. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04801.x. PMID: 16313615.

ISHINO T, YANO K, CHINZEI Y, YUDA M. Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS Biol*. 2004 Jan;2(1):E4. doi: 10.1371/journal.pbio.0020004. Epub 2004 Jan 20. PMID: 14737184; PMCID: PMC314464.

JANGPATARAPONGSA K, SIRICHAISINTHOP J, SATTABONGKOT J, CUI L, MONTGOMERY SM, LOOAREESUWAN S, TROYE-BLOMBERG M, UDOMSANGPETCH R. Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection. *Microbes Infect.* 2006 Mar;8(3):680-6. doi: 10.1016/j.micinf.2005.09.003. Epub 2006 Jan 11. PMID: 16469520.

JANGPATARAPONGSA K, XIA H, FANG Q, HU K, YUAN Y, PENG M, GAO Q, SATTABONGKOT J, CUI L, LI B, UDOMSANGPETCH R. Immunity to malaria in *Plasmodium vivax* infection: a study in central China. *PLoS One.* 2012;7(9):e45971. doi: 10.1371/journal.pone.0045971. Epub 2012 Sep 25. PMID: 23049909; PMCID: PMC3457974.

JOHN GK, DOUGLAS NM, VON SEIDLEIN L, NOSTEN F, BAIRD JK, WHITE NJ, PRICE RN. Primaquine radical cure of *Plasmodium vivax*: a critical review of the literature. *Malar J.* 2012 Aug 17;11:280. doi: 10.1186/1475-2875-11-280. PMID: 22900786; PMCID: PMC3489597.

JUNIOR SG, PAMPLONA VM, CORVELO TC, RAMOS EM. Quality of life and the risk of contracting malaria by multivariate analysis in the Brazilian Amazon region. *Malar J.* 2014 Mar 10;13:86. DOI: 10.1186/1475-2875-13-86. PMID: 24612550; PMCID: PMC3975302.

KAPPE SH, BUSCAGLIA CA, NUSSENZWEIG V. *Plasmodium* sporozoite molecular cell biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:29-59. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.011603.150935. PMID: 15473834.

KATO M, TSUJI-KAWAHARA S, KAWASAKI Y, KINOSHITA S, CHIKAISHI T, TAKAMURA S, FUJISAWA M, KAWADA A, MIYAZAWA M. Class switch recombination and somatic hypermutation of virus-neutralizing antibodies are not essential for control of friend retrovirus infection. *J Virol.* 2015 Jan 15;89(2):1468-73. doi: 10.1128/JVI.02293-14. Epub 2014 Nov 5. PMID: 25378499; PMCID: PMC4300674.

KEYT BA, BALIGA R, SINCLAIR AM, CARROLL SF, PETERSON MS. Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies. *Antibodies (Basel).* 2020 Oct 13;9(4):53. doi: 10.3390/antib9040053. PMID: 33066119; PMCID: PMC7709107.

KHO S, QOTRUNNADA L, LEONARDO L, ANDRIES B, WARDANI PAI, FRICOT A, HENRY B, HARDY D, MARGYANINGSIH NI, APRIYANTI D, PUSPITASARI AM, PRAYOGA P, TRIANTY L, et al. Hidden Biomass of Intact Malaria Parasites in the Human Spleen. *N Engl J Med.* 2021 May 27;384(21):2067-2069. doi: 10.1056/NEJMc2023884. PMID: 34042394.

KIM TS, SOHN Y, KIM JY, LEE WJ, NA BK, KANG YJ, LEE HW. Detection of antibodies against the CB9 to ICB10 region of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* among the inhabitants in epidemic areas. *Malar J.* 2014 Aug 12;13:311. doi: 10.1186/1475-2875-13-311. PMID: 25113121; PMCID: PMC4251697.

KITCHEN AD, CHIODINI PL. Malaria and blood transfusion. *Vox Sang.* 2006 Feb;90(2):77-84. doi: 10.1111/j.1423-0410.2006.00733.x. PMID: 16430664.

KRAEMER SM, SMITH JD. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Aug;9(4):374-80. doi: 10.1016/j.mib.2006.06.006. Epub 2006 Jun 30. PMID: 16814594.

KYEI-BAAFOUR E, OPPONG M, KUSI KA, FREMPONG AF, ACULLEY B, ARTHUR FKN, TIENDREBEOGO RW, SINGH SK, THEISEN M, KWEKU M, ADU B, HVIID L, OFORI MF. Suitability of IgG responses to multiple *Plasmodium falciparum* antigens as markers of transmission intensity and pattern. *PLoS One.* 2021 Apr 22;16(4):e0249936. doi: 10.1371/journal.pone.0249936. PMID: 33886601; PMCID: PMC8062017.

LABADIE-BRACHO MY, VAN GENDEREN FT, ADHIN MR. Malaria serology data from the Guiana shield: first insight in IgG antibody responses to *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* antigens in Suriname. *Malar J.* 2020 Oct 8;19(1):360. doi: 10.1186/s12936-020-03434-y. PMID: 33032606; PMCID: PMC7545893.

LEORATTI FM, TREVELIN SC, CUNHA FQ, ROCHA BC, COSTA PA, GRAVINA HD, TADA MS, PEREIRA DB, GOLENBOCK DT, ANTONELLI LR, GAZZINELLI RT. Neutrophil paralysis in *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(6):e1710. doi: 10.1371/journal.pntd.0001710. Epub 2012 Jun 26. PMID: 22745844; PMCID: PMC3383745.

LIMA-JUNIOR JC, BANIC DM, TRAN TM, MEYER VS, DE-SIMONE SG, SANTOS F, PORTO LC, MARQUES MT, MORENO A, BARNWELL JW, GALINSKI MR, OLIVEIRA-FERREIRA J. Promiscuous T-cell epitopes of *Plasmodium* merozoite surface protein 9 (PvMSP9) induces IFN-gamma and IL-4 responses in individuals naturally exposed to malaria in the Brazilian Amazon. *Vaccine.* 2010 Apr 19;28(18):3185-91. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.046. Epub 2010 Feb 26. PMID: 20189487; PMCID: PMC2861348.

LIMA-JUNIOR JC, TRAN TM, MEYER EV, SINGH B, DE-SIMONE SG, SANTOS F, DANIEL-RIBEIRO CT, MORENO A, BARNWELL JW, GALINSKI MR, OLIVEIRA-FERREIRA J. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals. *Vaccine.* 2008 Dec 2;26(51):6645-54. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.09.029. PMID: 18832003; PMCID: PMC4431613.

LIN CS, UBOLDI AD, EPP C, BUJARD H, TSUBOI T, CZABOTAR PE, COWMAN AF. Multiple *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 Complexes Mediate Merozoite Binding to Human Erythrocytes. *J Biol Chem.* 2016 Apr 1;291(14):7703-15. doi: 10.1074/jbc.M115.698282. Epub 2016 Jan 28. PMID: 26823464; PMCID: PMC4817195.

LIU J, WANG Y, XIONG E, HONG R, LU Q, OHNO H, WANG JY. Role of the IgM Fc Receptor in Immunity and Tolerance. *Front Immunol*. 2019 Mar 22;10:529. doi: 10.3389/fimmu.2019.00529. PMID: 30967868; PMCID: PMC6438924.

LONGLEY RJ, FRANÇA CT, WHITE MT, KUMPITAK C, SA-ANGCHAI P, GRUSZCZYK J, HOSTETLER JB, YADAVA A, KING CL, FAIRHURST RM, RAYNER JC, THAM WH, NGUITRAGOOL W, SATTABONGKOT J, MUELLER I. Asymptomatic *Plasmodium vivax* infections induce robust IgG responses to multiple blood-stage proteins in a low-transmission region of western Thailand. *Malar J*. 2017 Apr 28;16(1):178. doi: 10.1186/s12936-017-1826-8. PMID: 28454546; PMCID: PMC5410030.

LONGLEY RJ, GRIGG MJ, SCHOFFER K, OBADIA T, HYSLOP S, PIERA KA, NEKKAB N, MAZHARI R, TAKASHIMA E, TSUBOI T, HARBERS M, TETTEH K, DRAKELEY C, CHITNIS CE, HEALER J, et al. *Plasmodium vivax* malaria serological exposure markers: Assessing the degree and implications of cross-reactivity with P. knowlesi. *Cell Rep Med*. 2022 Jun 21;3(6):100662. doi: 10.1016/j.xcrm.2022.100662. PMID: 35732155; PMCID: PMC9245056.

LONGLEY RJ, WHITE MT, BREWSTER J, LIU ZSJ, BOURKE C, TAKASHIMA E, HARBERS M, THAM WH, HEALER J, CHITNIS CE, MONTEIRO W, LACERDA M, SATTABONGKOT J, TSUBOI T, MUELLER I. IgG Antibody Responses Are Preferential Compared With IgM for Use as Serological Markers for Detecting Recent Exposure to *Plasmodium vivax* Infection. *Open Forum Infect Dis*. 2021 May 22;8(6):ofab228. doi: 10.1093/ofid/ofab228. PMID: 34159216; PMCID: PMC8214013.

LONGLEY RJ, WHITE MT, TAKASHIMA E, BREWSTER J, MORITA M, HARBERS M, OBADIA T, ROBINSON LJ, MATSUURA F, LIU ZSJ, LI-WAI-SUEN CSN, THAM WH, HEALER J, HUON C, et al. Development and validation of serological markers for detecting recent *Plasmodium vivax* infection. *Nat Med*. 2020 May;26(5):741-749. doi: 10.1038/s41591-020-0841-4. Epub 2020 May 11. PMID: 32405064.

LOY DE, LIU W, LI Y, LEARN GH, PLENDERLEITH LJ, SUNDARARAMAN SA, SHARP PM, HAHN BH. Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Int J Parasitol*. 2017 Feb;47(2-3):87-97. DOI: 10.1016/j.ijpara.2016.05.008. Epub 2016 Jul 2. PMID: 27381764; PMCID: PMC5205579.

LUO H, JIA T, CHEN J, ZENG S, QIU Z, WU S, LI X, LEI Y, WANG X, WU W, ZHANG R, ZOU X, FENG T, DING R, ZHANG Y, CHEN YQ, SUN C, WANG T, FANG S, SHU Y. The Characterization of Disease Severity Associated IgG Subclasses Response in COVID-19 Patients. *Front Immunol*. 2021 Mar 4;12:632814. doi: 10.3389/fimmu.2021.632814. PMID: 33763078; PMCID: PMC7982848.

LUXEMBURGER C, NOSTEN F, WHITE NJ. Naturally acquired immunity to vivax malaria. *Lancet*. 1999 Jul 10;354(9173):162. doi: 10.1016/S0140-6736(05)75295-8. PMID: 10408515.

MARKUS MB. Do hypnozoites cause relapse in malaria? *Trends Parasitol.* 2015 Jun;31(6):239-45. doi: 10.1016/j.pt.2015.02.003. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25816801.

MASELLI LM, LEVY D, LAPORTA GZ, MONTEIRO AM, FUKUYA LA, FERREIRA-DA-CRUZ MF, DANIEL-RIBEIRO CT, DORLHIAC-LLACER PE, SALLUM MA, BYDŁOWSKI SP. Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* subclinical infection in non-endemic region: implications for blood transfusion and malaria epidemiology. *Malar J.* 2014 Jun 6;13:224. doi: 10.1186/1475-2875-13-224. PMID: 24906577; PMCID: PMC4059091.

MASSEY NC, GARROD G, WIEBE A, HENRY AJ, HUANG Z, MOYES CL, SINKA ME. A global bionomic database for the dominant vectors of human malaria. *Sci Data.* 2016 Mar 1;3:160014. DOI: 10.1038/sdata.2016.14. PMID: 26927852; PMCID: PMC4772652.

MCBRIDE JS, HEIDRICH HG. Fragments of the polymorphic Mr 185,000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. *Mol Biochem Parasitol.* 1987 Feb;23(1):71-84. doi: 10.1016/0166-6851(87)90189-7. PMID: 2437453.

MCCAFFERY JN, FONSECA JA, SINGH B, CABRERA-MORA M, BOHANNON C, JACOB J, ARÉVALO-HERRERA M, MORENO A. A Multi-Stage *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate Able to Induce Long-Lived Antibody Responses Against Blood Stage Parasites and Robust Transmission-Blocking Activity. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 May 1;9:135. doi: 10.3389/fcimb.2019.00135. PMID: 31119106; PMCID: PMC6504793.

MEDEIROS CMP, MOREIRA EUM, PIRES CV, TORRES LM, GUIMARÃES LFF, ALVES JRS, LIMA BAS, FONTES CJF, COSTA HL, BRITO CFA, SOUSA TN, NTUMNGIA FB, ADAMS JH, KANO FS, CARVALHO LH. Dynamics of IgM and IgG responses to the next generation of engineered Duffy binding protein II immunogen: Strain-specific and strain-transcending immune responses over a nine-year period. *PLoS One.* 2020 May 7;15(5):e0232786. doi: 10.1371/journal.pone.0232786. PMID: 32379804; PMCID: PMC7205269.

MEHRIZI AA, ZAKERI S, SALMANIAN AH, SANATI MH, DJADID ND. IgG subclasses pattern and high-avidity antibody to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in an unstable hypoendemic region in Iran. *Acta Trop.* 2009 Oct;112(1):1-7. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.05.016. Epub 2009 May 29. PMID: 19481997.

MEHRIZI AA, ZAKERI S, SALMANIAN AH, SANATI MH, DJADID ND. IgG subclasses pattern and high-avidity antibody to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in an unstable hypoendemic region in Iran. *Acta Trop.* 2009 Oct;112(1):1-7. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.05.016. Epub 2009 May 29. PMID: 19481997.

MEIBALAN E, MARTI M. Biology of Malaria Transmission. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017 Mar 1;7(3):a025452. doi: 10.1101/cshperspect.a025452. PMID: 27836912; PMCID: PMC5334247.

MÉNARD R, TAVARES J, COCKBURN I, MARKUS M, ZAVALA F, AMINO R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. Nat Rev Microbiol. 2013 Oct;11(10):701-12. doi: 10.1038/nrmicro3111. PMID: 24037451.

MERRICK CJ. Hypnozoites in *Plasmodium*: Do Parasites Parallel Plants? Trends Parasitol. 2021 Apr;37(4):273-282. doi: 10.1016/j.pt.2020.11.001. Epub 2020 Nov 27. PMID: 33257270.

MIAHIPOUR A, KESHAVARZ H, HEIDARI A, RAEISI A, REZAEIAN M, REZAIIE S. Genetic Variation of MSP-1 Gene in *Plasmodium vivax* Isolated from Patients in Hormozgan Province, Iran using SSCP-PCR. Iran J Parasitol. 2012;7(4):1-7. PMID: 23323085; PMCID: PMC3537474.

MILLAR SB, COX-SINGH J. Human infections with *Plasmodium knowlesi*--zoonotic malaria. Clin Microbiol Infect. 2015 Jul;21(7):640-8. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.03.017. Epub 2015 Apr 2. PMID: 25843504.

MILLER LH, ACKERMAN HC, SU XZ, WELLEMS TE. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. Nat Med. 2013 Feb;19(2):156-67. DOI: 10.1038/nm.3073. Epub 2013 Feb 6. PMID: 23389616; PMCID: PMC4783790.

MILLER LH, BARUCH DI, MARSH K, DOUMBO OK. The pathogenic basis of malaria. Nature. 2002 Feb 7;415(6872):673-9. doi: 10.1038/415673a. PMID: 11832955.

MILNER DA JR. Malaria Pathogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018 Jan 2;8(1):a025569. doi: 10.1101/cshperspect.a025569. PMID: 28533315; PMCID: PMC5749143.

MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DA BAHIA, 2021. Surto de malária no extremo sul do Estado é tema de 3º Fórum de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: www.mpba.mp.br/noticia/58020. > acesso 16 de outubro de 2022.

MORAIS CG, SOARES IS, CARVALHO LH, FONTES CJ, KRETTLI AU, BRAGA EM. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. Parasitol Res. 2005 Apr;95(6):420-6. doi: 10.1007/s00436-005-1314-x. Epub 2005 Mar 10. PMID: 15759156.

MOREIRA C.M., ABO-SHEHADA M., PRICE R.N., DRAKELEY C.J. A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. Malar. J. 2015;14:360. doi: 10.1186/s12936-015-0884-z.

MORENO-PÉREZ DA, RUÍZ JA, PATARROYO MA. Reticulocytes: *Plasmodium vivax* target cells. Biol Cell. 2013 Jun;105(6):251-60. doi: 10.1111/boc.201200093. Epub 2013 May 2. PMID: 23458497.

MOURÃO LC, MORAIS CG, BUENO LL, JIMENEZ MC, SOARES IS, FONTES CJ, GUIMARÃES LACERDA MV, XAVIER MS, BARNWELL JW, GALINSKI MR, BRAGA EM. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* blood-stage vaccine candidates (PvMSP-1₁₉ and PvMSP-3 α ₃₅₉₋₇₉₈ and their relationship with hematological features in malaria patients from the Brazilian Amazon. *Microbes Infect.* 2012 Aug;14(9):730-9. doi: 10.1016/j.micinf.2012.02.011. Epub 2012 Mar 8. PMID: 22445906.

MOXON CA, GIBBINS MP, MCGUINNESS D, MILNER DA JR, MARTI M. New Insights into Malaria Pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2020 Jan 24;15:315-343. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032640. Epub 2019 Oct 24. PMID: 31648610.

MUELLER I, GALINSKI MR, BAIRD JK, CARLTON JM, KOCHAR DK, ALONSO PL, DEL PORTILLO HA. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis.* 2009 Sep;9(9):555-66. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70177-X. PMID: 19695492.

MUKKALA AN, KWAN J, LAU R, HARRIS D, KAIN D, BOGGILD AK. An Update on Malaria Rapid Diagnostic Tests. *Curr Infect Dis Rep.* 2018 Oct 23;20(12):49. doi: 10.1007/s11908-018-0655-4. PMID: 30353400.

NKUMAMA IN, O'MEARA WP, OSIER FHA. Changes in Malaria Epidemiology in Africa and New Challenges for Elimination. *Trends Parasitol.* 2017 Feb;33(2):128-140. doi: 10.1016/j.pt.2016.11.006. Epub 2016 Dec 6. PMID: 27939610; PMCID: PMC6995363.

NOGUEIRA PA, ALVES FP, FERNANDEZ-BECERRA C, PEIN O, SANTOS NR, PEREIRA DA SILVA LH, CAMARGO EP, DEL PORTILLO HA. A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. *Infect Immun.* 2006 May;74(5):2726-33. doi: 10.1128/IAI.74.5.2726-2733.2006. PMID: 16622209; PMCID: PMC1459730.

O'FLAHERTY K, ROE M, FOWKES FJI. The role of naturally acquired antimalarial antibodies in subclinical *Plasmodium* spp. infection. *J Leukoc Biol.* 2022 May;111(5):1097-1105. doi: 10.1002/JLB.5MR1021-537R. Epub 2022 Jan 20. PMID: 35060185; PMCID: PMC9303632.

OLIVEIRA IC. Identificação de determinantes antigênicos da proteína 1 da superfície de merozoíto de *Plasmodium vivax* (PvMSP1) como potenciais biomarcadores de anemia. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

OWUSU-OFORI AK, BETSON M, PARRY CM, STOTHARD JR, BATES I. Transfusion-transmitted malaria in Ghana. *Clin Infect Dis.* 2013 Jun;56(12):1735-41. doi: 10.1093/cid/cit130. Epub 2013 Mar 5. PMID: 23463635.

PANDEY JP, MORAIS CG, FONTES CJ, BRAGA EM. Immunoglobulin GM 3 23 5,13,14 phenotype is strongly associated with IgG1 antibody responses to *Plasmodium vivax* vaccine candidate antigens PvMSP1-19 and PvAMA-1. *Malar J*. 2010 Aug 9;9:229. doi: 10.1186/1475-2875-9-229. PMID: 20696056; PMCID: PMC2924350.

PATGAONKAR M, HERBERT F, POWALE K, GANDHE P, GOGTAY N, THATTE U, PIED S, SHARMA S, PATHAK S. Vivax infection alters peripheral B-cell profile and induces persistent serum IgM. *Parasite Immunol*. 2018 Oct;40(10):e12580. doi: 10.1111/pim.12580. Epub 2018 Sep 11. PMID: 30102786.

PHILLIPS MA, BURROWS JN, MANYANDO C, VAN HUIJSDUIJNEN RH, VAN VOORHIS WC, WELLS TNC. Malaria. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Aug 3;3:17050. DOI: 10.1038/nrdp.2017.50. PMID: 28770814.

PIETRZAK HM, IOANNIDIS LJ, HANSEN DS. IgM⁺ memory B cells induced in response to *Plasmodium berghei* adopt a germinal centre B cell phenotype during secondary infection. *Parasitology*. 2020 Aug;147(9):994-998. doi: 10.1017/S003118202000061X. Epub 2020 Apr 13. PMID: 32279662.

PIRES CV, ALVES JRS, LIMA BAS, PAULA RB, COSTA HL, TORRES LM, SOUSA TN, SOARES IS, SANCHEZ BAM, FONTES CJF, NTUMNGIA FB, ADAMS JH, KANO FS, CARVALHO LH. Blood-stage *Plasmodium vivax* antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. *PLoS One*. 2018 Nov 12;13(11):e0207244. doi: 10.1371/journal.pone.0207244. PMID: 30419071; PMCID: PMC6231651.

PLEWES K, LEOPOLD SJ, KINGSTON HWF, DONDORP AM. Malaria: What's New in the Management of Malaria? *Infect Dis Clin North Am*. 2019 Mar;33(1):39-60. doi: 10.1016/j.idc.2018.10.002. PMID: 30712767.

PRUDÊNCIO M, RODRIGUEZ A, MOTA MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Nov;4(11):849-56. doi: 10.1038/nrmicro1529. PMID: 17041632.

PUNNATH K, DAYANAND KK, MIDYA V, CHANDRASHEKAR VN, ACHUR RN, KAKKILAYA SB, GHOSH SK, KUMARI SN, GOWDA DC. Acquired antibody responses against merozoite surface protein-1₁₉ antigen during *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections in South Indian city of Mangaluru. *J Parasit Dis*. 2021 Mar;45(1):176-190. doi: 10.1007/s12639-020-01288-4. Epub 2020 Oct 21. PMID: 33100734; PMCID: PMC7576553.

PUTAPORNTIP C, JONGWUTIWES S, FERREIRA MU, KANBARA H, UDOMSANGPETCH R, CUI L. Limited global diversity of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 4 gene. *Infect Genet Evol*. 2009 Sep;9(5):821-6. doi: 10.1016/j.meegid.2009.04.017. Epub 2009 May 4. PMID: 19409511; PMCID: PMC2743081.

PUTAPORNTIP C, JONGWUTIWES S, SAKIHAMA N, FERREIRA MU, KHO WG, KANEKO A, KANBARA H, HATTORI T, TANABE K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 10;99(25):16348-53. doi: 10.1073/pnas.252348999. Epub 2002 Dec 4. PMID: 12466500; PMCID: PMC138614.

QUISPE AM, POZO E, GUERRERO E, DURAND S, BALDEVIANO GC, EDGEL KA, GRAF PC, LESCANO AG. *Plasmodium vivax* hospitalizations in a monoendemic malaria region: severe vivax malaria? Am J Trop Med Hyg. 2014 Jul;91(1):11-7. doi: 10.4269/ajtmh.12-0610. Epub 2014 Apr 21. PMID: 24752683; PMCID: PMC4080549.

RAYNER JC, CORREDOR V, FELDMAN D, INGRAVALLO P, IDERABDULLAH F, GALINSKI MR, BARNWELL JW. Extensive polymorphism in the *Plasmodium vivax* merozoite surface coat protein MSP-3alpha is limited to specific domains. Parasitology. 2002 Nov;125(Pt 5):393-405. doi: 10.1017/s0031182002002317. PMID: 12458823.

RECHT J, SIQUEIRA AM, MONTEIRO WM, HERRERA SM, HERRERA S, LACERDA MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. Malar J. 2017 Jul 4;16(1):273. doi: 10.1186/s12936-017-1925-6. PMID: 28676055; PMCID: PMC5496604.

RETIEF F, CILLIERS L. Periodic pyrexia and malaria in antiquity. S Afr Med J. 2006 Aug;96(8):684, 686-8. PMID: 17024743.

RIBEIRO DE CASTRO DUARTE AM, FERNANDES LN, SILVA FS, SICCHI IL, MUCCI LF, CURADO I, FERNANDES A, MEDEIROS-SOUSA AR, CERETTI-JUNIOR W, MARRELLI MT, et al. Complexity of malaria transmission dynamics in the Brazilian Atlantic Forest. Curr Res Parasitol Vector Borne Dis. 2021 May 31;1:100032. doi: 10.1016/j.crvbd.2021.100032. PMID: 35284897; PMCID: PMC8906072.

RILEY EM, STEWART VA. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. Nat Med. 2013 Feb;19(2):168-78. doi: 10.1038/nm.3083. PMID: 23389617.

RISCO-CASTILLO V, TOPÇU S, MARINACH C, MANZONI G, BIGORGNE AE, BRIQUET S, BAUDIN X, LEBRUN M, DUBREMETZ JF, SILVIE O. Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. Cell Host Microbe. 2015 Nov 11;18(5):593-603. doi: 10.1016/j.chom.2015.10.006. PMID: 26607162.

ROBINSON L.J., WAMPFLER R., BETUELA I., KARL S., WHITE M.T., LI WAI SUEN C.S.N., HOFMANN N.E., KINBORO B., WALTMANN A., BREWSTER J., et al. Strategies for understanding and reducing the *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* hypnozoite reservoir in Papua New Guinean children: a randomised placebo-controlled trial and mathematical model. PLoS Med. 2015;12:e1001891. doi: 10.1371/journal.pmed.1001891

ROCA C, MÁLAGA-MACHACA ES, VERASTEGUI MR, SCOLA B, VALENCIA-AYALA E, MENDUIÑA MDC, NOAZIN S, BOWMAN NM, TINAJEROS F,

GILMAN RH; Working Group of Congenital Chagas in Bolivia and Peru. IgG Subclasses and Congenital Transmission of Chagas Disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2021 Sep 7;105(5):1187-1192. doi: 10.4269/ajtmh.20-1524. PMID: 34491223; PMCID: PMC8592205.

ROCHA D, DE MELO GC, CARNEIRO JMH, RIBEIRO M, RIBEIRO S, DE GODOY DT, COSTA E, DE ALMEIDA ACG, DE ANDRADE EF, ABRAHIM CMM, FRAIJI NA, FERREIRA AGP, MONTEIRO WM, et al. Use of a NAT-based assay to improve the surveillance system and prevent transfusion-transmitted malaria in blood banks. *Malar J.* 2020 Jul 31;19(1):275. doi: 10.1186/s12936-020-03345-y. Erratum in: *Malar J.* 2020 Sep 4;19(1):325. PMID: 32736625; PMCID: PMC7395345.

ROCHA MV, FRANÇO SO KS, LIMA LC, CAMARGO TM, MACHADO RLD, COSTA FTM, RÉNIA L, NOSTEN F, RUSSELL B, RODRIGUES MM, SOARES IS. Generation, characterization and immunogenicity of a novel chimeric recombinant protein based on *Plasmodium vivax* AMA-1 and MSP1₁₉. *Vaccine.* 2017 Apr 25;35(18):2463-2472. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.03.023. Epub 2017 Mar 22. PMID: 28341111.

RODRIGUES MH, RODRIGUES KM, OLIVEIRA TR, CÔMODO AN, RODRIGUES MM, KOCKEN CH, THOMAS AW, SOARES IS. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int J Parasitol.* 2005 Feb;35(2):185-92. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.11.003. Epub 2004 Dec 19. PMID: 15710439.

ROGERSON SJ, BEESON JG, LAMAN M, POESPOPRODJO JR, WILLIAM T, SIMPSON JA, PRICE RN; ACREME Investigators. Identifying and combating the impacts of COVID-19 on malaria. *BMC Med.* 2020 Jul 30;18(1):239. doi: 10.1186/s12916-020-01710-x. PMID: 32727467; PMCID: PMC7391033.

ROJAS-PEÑA ML, VALLEJO A, HERRERA S, GIBSON G, ARÉVALO-HERRERA M. Transcription Profiling of Malaria-Naïve and Semi-immune Colombian Volunteers in a *Plasmodium vivax* Sporozoite Challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Aug 5;9(8):e0003978. doi: 10.1371/journal.pntd.0003978. PMID: 26244760; PMCID: PMC4526565.

ROSSATI A, BARGIACCHI O, KROUMOVA V, ZARAMELLA M, CAPUTO A, GARAVELLI PL. Climate, environment and transmission of malaria. *Infez Med.* 2016 Jun 1;24(2):93-104. PMID: 27367318.

SALLARES R, BOUWMAN A, ANDERUNG C. The spread of malaria to Southern Europe in antiquity: new approaches to old problems. *Med Hist.* 2004 Jul;48(3):311-28. DOI: 10.1017/s0025727300007651. PMID: 16021928; PMCID: PMC547919.

SCOPEL KK, FONTES CJ, FERREIRA MU, BRAGA EM. *Plasmodium falciparum*: IgG subclass antibody response to merozoite surface protein-1 among Amazonian gold miners, in relation to infection status and disease expression. *Exp Parasitol.* 2005

Feb;109(2):124-34. doi: 10.1016/j.exppara.2004.12.002. Epub 2005 Jan 20. PMID: 15687019.

SCOPEL KK, FONTES CJ, NUNES AC, HORTA MF, BRAGA EM. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop.* 2004 Mar;90(1):61-4. doi: 10.1016/j.actatropica.2003.11.002. PMID: 14739024.

SECRETARIA DO ESTADO DO ESPIRITO SANTO. Boletim epidemiológico da malária na região. Superintendência regional de saúde, 2021.

SHAKIB F, STANWORTH DR. Human IgG subclasses in health and disease. (A review). *Ric Clin Lab.* 1980 Jul-Sep;10(3):463-79. doi: 10.1007/BF02938793. PMID: 6775363.

SHEN Y, BA Y, HU Y, WANG L, LI W. Relationship between the dynamic changes of serum 2019-nCoV IgM/IgG and patient immunity after 6 month hospital discharge. *Inflamm Res.* 2021 Feb;70(2):241-247. doi: 10.1007/s00011-020-01429-8. Epub 2021 Jan 1. PMID: 33385239; PMCID: PMC7775635.

SIDDIQUI FA, LIANG X, CUI L. *Plasmodium falciparum* resistance to ACTs: Emergence, mechanisms, and outlook. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2021 Aug;16:102-118. doi: 10.1016/j.ijpddr.2021.05.007. Epub 2021 May 26. PMID: 34090067; PMCID: PMC8188179.

SILVA-FILHO JL, LACERDA MVG, RECKER M, WASSMER SC, MARTI M, COSTA FTM. *Plasmodium vivax* in Hematopoietic Niches: Hidden and Dangerous. *Trends Parasitol.* 2020 May;36(5):447-458. doi: 10.1016/j.pt.2020.03.002. Epub 2020 Mar 31. Erratum in: *Trends Parasitol.* 2020 Jul;36(7):648-649. PMID: 32298632.

SINGH B, DANESHVAR C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Apr;26(2):165-84. DOI: 10.1128/CMR.00079-12. PMID: 23554413; PMCID: PMC3623376.

SINKA ME, BANGS MJ, MANGUIN S, RUBIO-PALIS Y, CHAREONVIRIYAPHAP T, COETZEE M, MBOGO CM, HEMINGWAY J, PATIL AP, TEMPERLEY WH, GETTING PW, KABARIA CW, BURKOT TR, HARBACH RE, HAY SI. A global map of dominant malaria vectors. *Parasit Vectors.* 2012 Apr 4;5:69. DOI: 10.1186/1756-3305-5-69. PMID: 22475528; PMCID: PMC3349467.

SINNIS P, ZAVALA F. The skin: where malaria infection and the host immune response begin. *Semin Immunopathol.* 2012 Nov;34(6):787-92. doi: 10.1007/s00281-012-0345-5. Epub 2012 Oct 2. PMID: 23053392; PMCID: PMC3934925.

SMITH JD, ROWE JA, HIGGINS MK, LAVSTSEN T. Malaria's deadly grip: cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell Microbiol.* 2013 Dec;15(12):1976-83. doi: 10.1111/cmi.12183. Epub 2013 Sep 4. PMID: 23957661; PMCID: PMC3836831.

SOARES IS, LEVITUS G, SOUZA JM, DEL PORTILLO HA, RODRIGUES MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect Immun*. 1997 May;65(5):1606-14. doi: 10.1128/iai.65.5.1606-1614.1997. PMID: 9125537; PMCID: PMC175182.

SOARES IS, OLIVEIRA SG, SOUZA JM, RODRIGUES MM. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Trop*. 1999 Jan 15;72(1):13-24. doi: 10.1016/s0001-706x(98)00078-3. PMID: 9924957.

SRINIVASAN P, YASGAR A, LUCI DK, BEATTY WL, HU X, ANDERSEN J, NARUM DL, MOCH JK, SUN H, HAYNES JD, MALONEY DJ, JADHAV A, SIMEONOV A, MILLER LH. Disrupting malaria parasite AMA1-RON2 interaction with a small molecule prevents erythrocyte invasion. *Nat Commun*. 2013;4:2261. doi: 10.1038/ncomms3261. PMID: 23907321; PMCID: PMC3755449.

SSEWANYANA I, REK J, RODRIGUEZ I, WU L, ARINAITWE E, NANKABIRWA JI, BEESON JG, MAYANJA-KIZZA H, ROSENTHAL PJ, DORSEY G, KAMYA MR, DRAKELEY C, GREENHOUSE B, TETTEH KKA. Impact of a Rapid Decline in Malaria Transmission on Antimalarial IgG Subclasses and Avidity. *Front Immunol*. 2021 Jan 27;11:576663. doi: 10.3389/fimmu.2020.576663. PMID: 33584643; PMCID: PMC7873448.

STEVENSON MM, RILEY EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 2004 Mar;4(3):169-80. doi: 10.1038/nri1311. PMID: 15039754.

STOWERS AW, CIOCE V, SHIMP RL, LAWSON M, HUI G, MURATOVA O, KASLOW DC, ROBINSON R, LONG CA, MILLER LH. Efficacy of two alternate vaccines based on *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in an Aotus challenge trial. *Infect Immun*. 2001 Mar;69(3):1536-46. doi: 10.1128/IAI.69.3.1536-1546.2001. PMID: 11179324; PMCID: PMC98053.

STURM A, AMINO R, VAN DE SAND C, REGEN T, RETZLAFF S, RENNENBERG A, KRUEGER A, POLLOK JM, MENARD R, HEUSSLER VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006 Sep 1;313(5791):1287-90. doi: 10.1126/science.1129720. Epub 2006 Aug 3. PMID: 16888102.

SUTHERLAND CJ, TANOMSING N, NOLDER D, OGUIKE M, JENNISON C, PUKRITTAYAKAMEE S, DOLECEK C, HIEN TT, DO ROSÁRIO VE, AREZ AP, PINTO J, MICHON P, ESCALANTE AA, et al. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J Infect Dis*. 2010 May 15;201(10):1544-50. DOI: 10.1086/652240. PMID: 20380562.

TAVARES J, FORMAGLIO P, MEDVINSKY A, MÉNARD R, AMINO R. Imaging sporozoite cell traversal in the liver of mice. *Methods Mol Biol.* 2013;923:401-10. doi: 10.1007/978-1-62703-026-7_28. PMID: 22990794.

TAYIPTO Y, ROSADO J, GAMBOA D, WHITE MT, KINIBORO B, HEALER J, OPI DH, BEESON JG, TAKASHIMA E, TSUBOI T, HARBERS M, ROBINSON L, MUELLER I, LONGLEY RJ. Assessment of IgG3 as a serological exposure marker for *Plasmodium vivax* in areas with moderate-high malaria transmission intensity. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Aug 9;12:950909. doi: 10.3389/fcimb.2022.950909. PMID: 36017364; PMCID: PMC9395743.

THOUVENEL CD, FONTANA MF, NETLAND J, KRISHNAMURTY AT, TAKEHARA KK, CHEN Y, SINGH S, MIURA K, KEITANY GJ, LYNCH EM, PORTUGAL S, MIRANDA MC, KING NP, et al. Multimeric antibodies from antigen-specific human IgM+ memory B cells restrict *Plasmodium* parasites. *J Exp Med.* 2021 Apr 5;218(4):e20200942. doi: 10.1084/jem.20200942. PMID: 33661302; PMCID: PMC7938364.

UBILLOS I, CAMPO JJ, JIMÉNEZ A, DOBAÑO C. Development of a high-throughput flexible quantitative suspension array assay for IgG against multiple *Plasmodium falciparum* antigens. *Malar J.* 2018 May 29;17(1):216. doi: 10.1186/s12936-018-2365-7. PMID: 29843713; PMCID: PMC5975539.

VALENZUELA NM, SCHAUB S. The Biology of IgG Subclasses and Their Clinical Relevance to Transplantation. *Transplantation.* 2018 Jan;102(1S Suppl 1):S7-S13. doi: 10.1097/TP.0000000000001816. PMID: 29266057.

VAN DEN HOOGEN LL, BARENG P, ALVES J, REYES R, MACALINAO M, RODRIGUES JM, FERNANDES JM, GOMÉZ LF, HALL T, SINGH SK, FORNACE K, LUCHAVEZ J, KITCHEN A, et al. Comparison of Commercial ELISA Kits to Confirm the Absence of Transmission in Malaria Elimination Settings. *Front Public Health.* 2020 Sep 9;8:480. doi: 10.3389/fpubh.2020.00480. PMID: 33014975; PMCID: PMC7509087.

VARO R, CHACCOUR C, BASSAT Q. Update on malaria. *Med Clin (Barc).* 2020 Nov 13;155(9):395-402. English, Spanish. DOI: 10.1016/j.medcli.2020.05.010. Epub 2020 Jun 30. PMID: 32620355.

VIDARSSON G, DEKKERS G, RISPENS T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014 Oct 20;5:520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520. PMID: 25368619; PMCID: PMC4202688.

VILLASIS E, GARRO K, ROSAS-AGUIRRE A, RODRIGUEZ P, ROSADO J, GAVE A, GUZMAN-GUZMAN M, MANRIQUE P, WHITE M, SPEYBROECK N, VINETZ JM, TORRES K, GAMBOA D. PvMSP8 as a Novel *Plasmodium vivax* Malaria Sero-Marker for the Peruvian Amazon. *Pathogens.* 2021 Mar 2;10(3):282. doi: 10.3390/pathogens10030282. PMID: 33801386; PMCID: PMC7999794.

WALKER MR, KNUDSEN AS, PARTEY FD, BASSI MR, FRANK AM, CASTBERG FC, SARBAH EW, OFORI MF, HVIID L, BARFOD L. Acquisition and decay of IgM and IgG responses to merozoite antigens after *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian children. PLoS One. 2020 Dec 17;15(12):e0243943. doi: 10.1371/journal.pone.0243943. PMID: 33332459; PMCID: PMC7746192.

WEISS GE, GILSON PR, TAECHALERTPAISARN T, THAM WH, DE JONG NW, HARVEY KL, FOWKES FJ, BARLOW PN, RAYNER JC, WRIGHT GJ, COWMAN AF, CRABB BS. Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. PLoS Pathog. 2015 Feb 27;11(2):e1004670. doi: 10.1371/journal.ppat.1004670. PMID: 25723550; PMCID: PMC4344246.

WELLS TN, BURROWS JN, BAIRD JK. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. Trends Parasitol. 2010 Mar;26(3):145-51. doi: 10.1016/j.pt.2009.12.005. Epub 2010 Feb 3. PMID: 20133198.

WHITE NJ, PUKRITTAYAKAMEE S, HIEN TT, FAIZ MA, MOKUOLU OA, DONDORP AM. Malaria. Lancet. 2013 Feb 22;383(9918):723-35. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60024-0. Epub 2013 Aug 15. PMID: 23953767.

WHITE NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. Clin Infect Dis. 2008 Jan 15;46(2):172-3. DOI: 10.1086/524889. PMID: 18171246.

WOOLLEY DW, MERRIFIELD RB. Anomalies of the structural specificity of peptides. Ann N Y Acad Sci. 1963 Feb 4; 104:161-71. doi: 10.1111/j.1749-6632.1963.tb17661.x. PMID: 14001849.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2021.

YUDA M, ISHINO T. Liver invasion by malarial parasites--how do malarial parasites break through the host barrier? Cell Microbiol. 2004 Dec;6(12):1119-25. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00474.x. PMID: 15527492.

ZIMMERMAN PA, FERREIRA MU, HOWES RE, MERCEREAU-PUIJALON O. Red blood cell polymorphism and susceptibility to *Plasmodium vivax*. Adv Parasitol. 2013;81:27-76. doi: 10.1016/B978-0-12-407826-0.00002-3. PMID: 23384621; PMCID: PMC3728992.

9. ANEXO

Pedido de patente do peptídeo 314.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 020310 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

Dados do Pedido**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** KIT, MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA E USOS**Resumo:** A presente tecnologia trata de um kit e um método para diagnóstico de malária, baseados no uso de um peptídeo sintético definido pela SEQ ID No1, derivado da proteína 1 da superfície de merozoíto de *Plasmodium vivax* (PvMSP-1). O peptídeo se mostrou capaz de diferenciar infecções por essa espécie daquelas provocadas por *P. falciparum*, além de não ser reconhecido por indivíduos não infectados, conferindo alta especificidade ao método proposto.**Figura a publicar:** 3**Inventores:** ÉRIKA MARTINS BRAGA, GUSTAVO PEREIRA CARDOSO DE OLIVEIRA, ALINE MARZANO MIRANDA, LETÍCIA REIS CUSSAT, BEATRIZ CAROLINA MEDEIROS RODRIGUES**Inventores:** ÉRIKA MARTINS BRAGA, GUSTAVO PEREIRA CARDOSO DE OLIVEIRA, ALINE MARZANO MIRANDA, LETÍCIA REIS CUSSAT, BEATRIZ CAROLINA MEDEIROS RODRIGUES