

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Camila Maia Pantuzzo Medeiros

Avaliação longitudinal da resposta dos anticorpos IgM e IgG contra a *Duffy binding protein* II (DBPII) do *Plasmodium vivax* em indivíduos expostos à malária na Amazônia Brasileira.

Belo Horizonte/MG

Setembro de 2020

Camila Maia Pantuzzo Medeiros

Avaliação longitudinal da resposta dos anticorpos IgM e IgG contra a *Duffy binding protein* II (DBPII) do *Plasmodium vivax* em indivíduos expostos à malária na Amazônia Brasileira.

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Parasitologia

Orientadora: Dra. Luzia Helena Carvalho

Coorientadora: Dra. Letícia de Menezes Torres

Belo Horizonte/MG

Setembro de 2020

- 043 Medeiros, Camila Maia Pantuzzo.
Avaliação longitudinal da resposta dos anticorpos IgM e IgG contra a *Duffy binding protein* II (DBPII) do *Plasmodium vivax* em indivíduos expostos à malária na Amazônia Brasileira [manuscrito] / Camila Maia Pantuzzo Medeiros. – 2020.
- 94 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Dra. Luzia Helena Carvalho. Coorientadora: Dra. Letícia de Menezes Torres.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
1. Malária. 2. Plasmodium vivax. 3. Malária por Plasmodium Vivax. 4. Imunoglobulina M. 5. Imunoglobulina G. I. Carvalho, Luzia Helena. II. Torres, Letícia de Menezes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

TESE 308/2020/06

**TÍTULO DA TESE: "AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA RESPOSTA DOS ANTICORPOS IGM E IGG
CONTRA A DUFFY BINDING PROTEIN II (DBPII) DO PLASMODIUM VIVAX NA AMAZÔNIA
BRASILEIRA"**

ALUNA: CAMILA MAIA PANTUZZO MEDEIROS

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROTOZOOLOGIA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **trinta de setembro de 2020**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

Joseli de Oliveira Ferreira - IRR/FIOCRUZ

Membro externo - IRR/FIOCRUZ

Stefanie Costa Pinto Lopes

Membro externo - Fiocruz-Amazonas /Manaus - AM

Hélida Monteiro de Andrade

Membro interno - UFMG

Pedro Augusto Carvalho Costa

Membro interno - UFMG

Luzia Helena Carvalho

Orientadora -IRR/FIOCRUZ

Belo Horizonte, 30 de setembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade**, **Coordenador(a)**, em 16/01/2023, às 10:34, 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 **2019268** e o código CRC **21E82D4B**.

*Dedico este trabalho a Deus, pelo imenso apoio,
e a minha amada filha Ana Raquel,
por me motivar ainda mais
a buscar por um mundo melhor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter estado ao meu lado o tempo todo. Hoje eu sei que quanto maior o desafio, mais forte é o seu apoio e melhor é o aprendizado!

Agradeço imensamente a minha orientadora Dra. Luzia, não só por ter me estendido a mão no momento mais árduo da minha caminhada, mas também por ter me dado todo o apoio e suporte para completar esta bela jornada. Agradeço pelos valiosos ensinamentos para minha formação como doutora, pelo incentivo, pela orientação, por ser uma inspiração e por confiar a mim um projeto tão especial. Agradeço também pelo zelo e carinho. Ver seu trabalho me devolveu o amor pela pesquisa.

Aos moradores do assentamento agrícola de Rio Pardo por acreditarem e participarem do nosso trabalho, sempre com gentileza e boa vontade por tanto tempo. Sem vocês nada disso seria possível.

Às agências de fomento pelo apoio financeiro. Em especial ao CNPq pelo fornecimento da minha bolsa de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da UFMG pela oportunidade e, em especial, à Sumara e à Sibeles por toda disponibilidade e carinho.

À Dra Flora por acreditar em mim, me motivar e ajudar. Por todo o tempo na bancada dedicado a mim e a este trabalho, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, pela paciência e carinho.

Às Dras Cristiana e Taís não só pela contribuição intelectual, mas também pela preocupação e cuidado comigo e com todos do laboratório. Pelo exemplo de ética, de dedicação e de conquistas. Vocês também me inspiram!

À Dra Letícia por ser um exemplo de compromisso e seriedade. Obrigada por me orientar neste trabalho e pelos ensinamentos.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária pelos ensinamentos, pelas trocas diárias, pelo apoio e pelos abraços, pelos seminários e pela preocupação. Fazer parte deste laboratório foi uma experiência fantástica e enriquecedora, da qual nunca esquecerei. Agradeço em especial à Denise e ao Luís pelo exemplo de compromisso, dedicação, bondade e por todos nossos almoços. À Danielle por ser a pessoa mais dócil, sábia e coerente que já conheci, à Gabi pela prontidão em ajudar e à Michelle pelo ombro amigo.

Ao Eduardo por toda ajuda, companhia e disposição e à Ruth pelos ensinamentos e pela inspiração, você é uma mulher fantástica!

À Mika e ao Geraldo por tamanha dedicação ao laboratório, aos professores e aos alunos. Todos os dias vocês nos amparam, nos alegam e organizam o laboratório.

À Luiza Mourão por ser o maior exemplo de ética, lealdade, amizade e bondade dentro e fora do meio acadêmico. Muito obrigada por tudo Lu, graças a você eu continuo acreditando na humanidade.

À minha mãe Cláudia por sempre me querer bem e lutar por isso. Nessa jornada os ensinamentos mais preciosos foram os que você me deu. Obrigada por abdicar da sua vida e do seu tempo pela minha formação.

Ao meu pai Geraldo por me apoiar e amar incondicionalmente. Você foi meu maior amparo nos momentos mais árduos e duvidosos, obrigada por estar sempre ao meu lado.

Ao meu irmão Rafael por todos os ensinamentos, conselhos, abraços, apoio, preocupação e amor. Obrigada por ser um exemplo de dedicação e sucesso.

Ao meu companheiro Weverlin por tudo! Só você sabe realmente como foi esta caminhada e por isso meu agradecimento especial é para você. Obrigada por enxugar todas as minhas lágrimas, pelas palavras de motivação, por entender minhas frustrações, meus medos e minha raiva, mas nunca me deixar desistir. Por também me apoiar incondicionalmente e enfrentar cada desafio comigo. Por sempre me ouvir e saber esta tese de trás pra frente. Obrigada por todas as mensagens, todo o amor, admiração, sinceridade, apoio, cuidado, lealdade. Por cuidar da nossa filha e do nosso lar como eu mesma cuidaria ou melhor.

À minha filha Ana Raquel por vir ao mundo no meio deste doutorado. Você ressignificou a minha vida! Trouxe luz e amor para o mundo, me fortaleceu e me mostrou que eu sempre posso mais. Você é minha maior motivação!

A toda minha família, Medeiros e Pantuzzo, pelo companheirismo, amor, cuidado, apoio e por serem minha base. Amo cada um de vocês, obrigada por tudo!

A todos os meus amigos por terem deixado essa caminhada mais leve. Em especial à Bianca, à Nati e a Thamyris por todo o amparo, pelos desabafos, pelo ombro amigo, pelas resenhas, pelos conselhos. Vocês são muito especiais para mim.

“O principal objetivo da vida é ajudar os outros.”

“Seja a mudança que você quer ver no mundo.”

“O mundo pertence a Humanidade!”

Dalai Lama

Resumo

Entre os parasitos causadores da malária humana, o *Plasmodium vivax* é a espécie com maior distribuição mundial. O *P. vivax* invade os reticulócitos humanos através de uma via principal dependente da interação entre a região II da *Duffy Binding Protein* (DBPII), presente nas organelas apicais do parasito, e seu receptor cognato na superfície do eritrócito, o antígeno Duffy receptor para quimiocinas (DARC). Embora a DBPII seja uma das principais candidatas à vacina contra a malária causada por *P. vivax*, a região II do ligante é altamente polimórfica e induz uma resposta imune humoral do tipo cepa-específica. Recentemente, nosso grupo de pesquisa contribuiu para o desenvolvimento de um novo candidato vacinal baseado na DBPII, denominado DEKnull-2, que retém os epítomos funcionais conservados necessários para a ligação ao receptor e dimerização da DBP. Estudos iniciais de prova de conceito demonstraram que anticorpos anti- DEKnull-2 são naturalmente produzidos por indivíduos expostos ao *P. vivax* cuja resposta imune caracteriza-se pela presença de anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC (BIAbs). Embora os anticorpos IgG anti-DBPII já tenham sido associados à imunidade protetora, o papel dos anticorpos IgM ainda permanece pouco estudado. O presente estudo teve como objetivo investigar a relação entre a resposta dos anticorpos IgM e IgG anti-DBPII, com foco na resposta dirigida aos epítomos conservados da DEKnull-2, bem como em epítomos variáveis da proteína, presentes na cepa Sal1, variante natural que circula na área de estudo. Para tanto, buscou-se caracterizar sorologicamente 163 indivíduos adultos, com história de longa exposição à malária por *P. vivax*, em uma comunidade rural da Amazônia brasileira (Rio Pardo, AM). O desenho do estudo incluiu uma coorte retrospectiva de 9 anos, com cortes transversais realizados durante períodos de alta (fases I e III) e baixa transmissão de malária (fase II). A resposta de anticorpos IgM/IgG foi avaliada pela sorologia convencional (ELISA) utilizando-se proteínas recombinantes da DBPII (DEKnull-2 e Sal1), sendo a avidéz dos anticorpos avaliada através da adição de um agente desnaturante ao ensaio. A atividade funcional dos anticorpos (BIAbs) foi determinada através de um ensaio *in vitro* com células transfectadas expressando a proteína DBPII. Em conjunto, os resultados da coorte permitiram demonstrar que (i) a resposta de anticorpos IgM foi direcionada aos epítomos variantes DBPII (Sal1, variante cepa-específica), enquanto a resposta de anticorpos IgG aos epítomos conservados da proteína (DEKnull-2); (ii) os anticorpos IgM variante-específicos foram relativamente estáveis ao longo do estudo, mas os anticorpos IgG variante-específicos não foram mantidos no período de baixa transmissão; (iii) os anticorpos IgG voltados aos epítomos conservados da DEKnull-2 foram relativamente estáveis e associados a resposta de anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC (BIAbs); por outro lado, a resposta de anticorpos IgM não foi associada (positiva ou negativamente) com BIAbs; (iv) a presença e os níveis de anticorpos IgM/ IgG não foi associada com a presença do *P. vivax* no sangue circulante (detectados por microscopia ótica ou pelos ensaios de PCR); (v) independentemente da proteína estudada, ambas as respostas de anticorpos foram de alta avidéz, e, finalmente, (v) a resposta de IgG não se correlacionou com a resposta de IgM. Em conclusão, a resposta de anticorpos IgM de longa-duração contra a DBPII parece ser predominantemente variante-específica, enquanto a resposta de IgG de longa-duração é direcionada aos epítomos conservados de DBPII. Este foi o primeiro estudo longitudinal que investigou a relação entre a resposta dos anticorpos IgM/IgG contra DBPII,

e estudos futuros fazem-se necessários para determinar qual a contribuição da resposta IgM para a imunidade induzida pela malária.

Palavras-chave: *Plasmodium vivax*, anticorpos IgM/IgG, malária, *Duffy Binding Protein II* (DBPII)

Abstract

Plasmodium vivax is the most widespread human malaria parasite. This parasite invades reticulocytes via a major pathway that depends on the interaction between the apical protein Duffy Binding Protein II (DBPII) and its cognate receptor on the erythrocyte surface, the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC). While DBPII is a leading *P. vivax* malaria vaccine candidate, the ligand domain is highly polymorphic and induces strain-specific humoral immune response. Recently, we developed a surface-engineered DBPII vaccine candidate, named DEKnull-2, which retains the conserved functional epitopes needed for receptor binding and DBP dimerization. Proof-of-concept studies demonstrated that DEKnull-2 is highly recognized by naturally exposed *P. vivax* individuals who have broadly neutralizing antibodies able to block DBPII-DARC interaction (BIAbs). Although IgG antibodies have been associated with DBPII protective immunity, the role of IgM antibodies remain largely understudied. Hence, the goal of the current study was to investigate the relationship between IgG and the less studied IgM antibody response against conserved (DEKnull-2) and variable (Sal1, a natural variant circulating in the study area) DBPII epitopes. For this purpose, we serologically evaluated 163 adults with long-term exposure to malaria in a rural community of the Brazilian Amazon (Rio Pardo, AM). The study design included a 9-year retrospective cohort study, with cross-sectional surveys carried out during periods of high (phases I e III) and low malaria transmission (phase II). The conventional antibody response was determined by ELISA assay using DBPII-related recombinant proteins (DEKnull-2 and Sal1), with antibody avidity assessed by using a denaturing agent. The functional antibody response (BIAbs) was determined through an *in vitro* functional assay with DBPII-transfected cells. Taken together, the results of this long-term follow-up study showed that (i) IgM antibody response towards DBPII-variant-epitopes (strain-specific Sal1), while IgG antibody response towards the conserved epitopes of the protein (DEKnull-2); (ii) IgM variant-specific DBPII antibodies were relatively stable throughout the study, but IgG variant-specific antibodies were poorly sustained at low transmission period; (iii) whereas epitope-conserved IgG antibodies were relatively stable overtime and associated with broadly binding-inhibitory IgG antibodies (BIAbs), IgM antibody response was not associated (positively or negatively) with BIAbs; (iv) peripheral malaria infections (detected by microscopy or PCR-based assay) did not correlate with either IgG or IgM antibody responses; (v) regardless the protein assayed, both antibody responses were related with antibodies of high avidity, with IgG > IgM; (v) finally, the response of IgG did not correlate with IgM response. In conclusion, the long-term IgM response to DBPII appears to be predominantly variant-specific, while the long-term IgG response is directed to the conserved epitopes of DBPII. This was the first follow-up study that investigated the relationship between IgM /IgG antibodies against DBPII, and future studies should explore the contribution of IgM response to malaria-induced immunity.

Key words: *Plasmodium vivax*, IgM/IgG antibodies, malaria, *Duffy Binding Protein II* (DBPII).

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa de risco da malária, por município, no Brasil, em 2018.....	4
Figura 2. Esquema ilustrativo do ciclo biológico dos plasmódios, com ênfase no <i>Plasmodium vivax</i>	5
Figura 3. Modelos propostos para a resposta de anticorpos IgM e IgG contra a malária.....	14
Figura 4. Proteína de ligação ao grupo Duffy do <i>Plasmodium vivax</i> (PvDBP).....	17
Figura 5. Proteínas recombinantes baseadas em regiões conservadas da DBP região II.....	19
Figura 6. Mapa ilustrando a área de estudo, comunidade de Rio Pardo, Estado do Amazonas, Brasil.....	26
Figura 7. Casos de malária notificados no assentamento agrícola de Rio Pardo (Amazonas, Brasil) durante o período de estudo, 2008–2017.....	28
Figura 8. Níveis de anticorpos IgM epítomos variantes (DBPII-Sal1) ou conservados (DEKnull-2) avaliados na população de estudo, durante as fases de alta (I e III) e baixa (II) transmissão de malária.....	36
Figura 9. Níveis de anticorpos IgG epítomos variantes (DBPII-Sal1) ou conservados (DEKnull-2) avaliados na população de estudo, durante as fases de alta (I e III) e baixa (II) transmissão de malária.....	38
Figura 10. Razão temporal entre as respostas de IgG e IgM dirigidas a epítomos variantes (DBPII-Sal1) ou conservados (DEKnull-2) da DBPII.....	40
Figura 11. Níveis de anticorpos IgM (A) e IgG (B) específicos contra a MSP-1 ₁₉ do <i>P. vivax</i> avaliados na população de Rio Pardo, AM, durante fases de alta (I e III) e baixa (II) transmissão de malária.....	42
Figura 12. Perfil da resposta de IgM e IgG dos 42 indivíduos que apresentaram infecção patente ou subpatente por <i>P. vivax</i> em algum momento do estudo longitudinal (Linha de base a 9 anos).....	44
Figura 13. Ausência de correlação entre as respostas de anticorpos IgM e IgG contra antígenos da DBPII.....	45
Figura 14. Resposta de anticorpos IgM e IgG anti-MSP-1 ₁₉ dos 42 indivíduos que apresentaram infecção aguda por <i>P. vivax</i> em algum momento do estudo longitudinal.....	46
Figura 15. Perfil de resposta dos anticorpos IgM e IgG específicos para epítomos variantes (DBPII-Sal1) e conservados (DEKnull-2) nos indivíduos estudados segundo o status de anticorpos inibitórios de ligação DBPII-DARC (BIAbs).....	48

Figura 16. Avidéz da ligação entre os anticorpos IgM e IgG dos indivíduos de Rio Pardo e os epítomos variantes (DBPII-Sal1) (A) e conservados (DEKnull-2) (B) da DBPII durante fases de alta (I e III) e baixa (II) transmissão de malária.....**50**

Figura 17. Avidéz entre os anticorpos IgM e IgG e as proteínas baseadas na DBPII nos indivíduos de Rio Pardo classificados conforme o status de anticorpos inibitórios da ligação DBPII-DARC (BIAbs).....**51**

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características demográficas, epidemiológicas e imunológicas dos 163 indivíduos estudados no momento do recrutamento (linha-de-base).....35

Tabela 2. Níveis de anticorpos IgM contra as proteínas baseadas na DBPII do *P. vivax* ao longo do estudo de coorte.....37

Tabela 3. Níveis de anticorpos IgG contra as proteínas baseadas na DBPII do *P. vivax* ao longo do estudo de coorte.....49

Tabela 4. Níveis de anticorpos IgM e IgG contra a proteína MSP-1₁₉ do *P. vivax* durante os 9 anos do estudo de coorte.....53

Lista de Abreviações

ADCI	Antibody-Dependent Cellular Inhibition
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
ANOVA	Análise de Variância
BIAbs	Binding Inhibitory Antibodies
CD71	Cluster of Differentiation 71
DARC	Duffy Antigen/Receptor for Chemokines
DBPII	Duffy Binding Protein region II
DC	Domínio Citoplasmático
DDT	DicloroDifenilTricloroetano
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxiribonucleic Acid
DO	Densidade ótica
DTT	1,4-DithioThreiTol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EGF	Epidermal Growth factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FcR	Fc Receptor
GPI	GlicosilPhosfatidilInositol
G6PD	Glicose-6-Fosfato Desidrogenase
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INCRA	Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária
IPA	Índice Parasitário Anual
IPTG	IsoPropil- β -D-1-ThioGalactopiranosídeo
IQR	InterQuartile Range
IR	Índice de Reatividade
kDa	KiloDaltons
MHC	Major Histocompatibility Complex
MS	Ministério da Saúde
MSP	Merozoite Surface Protein
NK	Natural Killer
NO	Nitric Oxide
NR	Não Respondedor para BIAbs anti-DBPII
OPD	O-Phenylenediamine (Dihydrochloride)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
Pos %	Frequência de positivos

ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Respondedor Temporário para BIAbs anti-DBPII
RP	Respondedor Persistente para BIAbs anti-DBPII
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SIVEP	Sistema de Vigilância Epidemiológica
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TM	TransMembrana
WHO	World Health Organization (OMS - Organização Mundial de Saúde)

Sumário

1-INTRODUÇÃO	18
1.1-Malária.....	18
1.2-Epidemiologia da Malária no Mundo e no Brasil.....	19
1.3- Ciclo biológico da malária humana com foco no <i>P. vivax</i>	21
1.3.1- Características biológicas do <i>P. vivax</i> e suas implicações no combate à doença	24
1.4-Imunidade naturalmente adquirida contra a malária	25
1.4.1. -Papel dos anticorpos na resposta imune contra a malária.....	27
1.5-Antígenos alvo para o desenvolvimento de vacinas contra as formas sanguíneas do <i>P. vivax</i>	31
1.5.1- Proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP-1).....	32
1.5.2- Proteína de ligação ao grupo sanguíneo Duffy do <i>Plasmodium vivax</i> (DBP)33	
1.5.3- Família DEKnull	37
2-Justificativa	39
3- Objetivos	41
3.1- Objetivo geral	41
3.1.1- Objetivos específicos	41
4- Metodologia	42
4.1- Área e população de estudo	42
4.2-Desenho do estudo com abordagem retrospectiva longitudinal	44
4.3- Coleta e processamento das amostras de sangue.....	45
4.3.1. Diagnóstico de malária.....	46
4.4- Proteínas recombinantes de formas sanguíneas do <i>P. vivax</i>	46
4.4.1- Proteína de ligação ao grupo sanguíneo Duffy do <i>Plasmodium vivax</i> região II (PvDBPII).....	46
4.4.2- DEKnull-2	47
4.4.3- Proteína de superfície de merozoíto 1 (MSP-1 ₁₉) do <i>P. vivax</i>	47
4.5- Detecção de anticorpos IgG e IgM contra proteínas recombinantes do <i>P. vivax</i> através do ensaio imunoenzimático convencional (ELISA).....	47
4.6- Avaliação da avidéz dos anticorpos IgM e IgG contra as proteínas recombinantes do <i>P. vivax</i>	48
4.7- Ensaio funcional para detecção de anticorpos inibitórios (BIAbs) contra a proteína DBPII do <i>P. vivax</i>	49
4.8-Análises Estatísticas	50
5- Resultados	51

5.1- Características dos indivíduos estudados e resposta de anticorpos antígeno-específica na linha de base do estudo	51
5.2- Dinâmica da resposta de anticorpos contra epítomos variantes e conservados da DBPII durante períodos de alta e baixa transmissão de malária na área de estudo	52
5.2.1- Resposta de anticorpos IgM contra as proteínas da DBPII.....	52
5.2.2- Resposta de anticorpos IgG contra as proteínas da DBPII.....	54
5.2.3- Razão entre a resposta dos anticorpos IgG e IgM contra a DBPII	56
5.3- Dinâmica da resposta de anticorpos IgM e IgG específicos contra a MSP-1 ₁₉ ...	58
5.4- Influência das infecções agudas pelo <i>P. vivax</i> no perfil de resposta dos anticorpos IgM e IgG contra as proteínas baseadas na DBPII	60
5.5- Influência das infecções agudas pelo <i>P. vivax</i> no perfil de resposta dos anticorpos IgM e IgG contra a proteína MSP-1 ₁₉	62
5.6- Perfil da resposta de anticorpos IgM e IgG contra a DBPII em função da resposta de anticorpos inibitórios da interação DBPII/DARC	64
5.7- Avaliação da avidéz dos anticorpos IgM e IgG contra as proteínas DBPII	66
6- Discussão.....	69
7- Conclusões	74
8- Referências Bibliográficas	75
Anexo 1.....	79

1-INTRODUÇÃO

1.1-Malária

A malária tem sido um grande problema na história da humanidade desde a Antiguidade. Existem relatos da febre periódica característica desta doença na China em 2700 a.C., assim como na antiga Mesopotâmia no século VI a.C. (revisto por Cox, 2002). Durante o Império Romano ela era conhecida como “febre romana” e pode ter contribuído para o declínio deste império (Sallares *et al.*, 2004). Nesta época ela passou a ser associada aos pântanos e coleções d’água estagnada e os italianos passaram a denominá-la de mal’aria (maus ares) dando origem ao termo malária (Reiter, 2000).

Apenas em 1880 iniciou-se o progresso na investigação científica da malária. Charles Louis Alphonse Laveran, um médico francês, observou pela primeira vez parasitos protistas no sangue periférico das pessoas doentes (Laveran, 1881). Ele atribuiu a causa da malária a esses organismos e ganhou o Nobel de Medicina em 1907 pela descoberta.

Hoje já se sabe que os protozoários do gênero *Plasmodium* são os causadores da malária sendo transmitidos ao homem através de mosquitos vetores do gênero *Anopheles* (Cowman *et al.*, 2016). As espécies de *Plasmodium* mais frequentemente associadas à infecção humana são: *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium malarie* (Laveran, 1881), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) e *Plasmodium Knowlesi* (Giuseppe, 1927).

Do ponto de vista de saúde pública, o maior impacto da malária humana está associado ao *P. falciparum* e *P. vivax*, sendo a primeira a espécie considerada mais patogênica e a segunda a de maior distribuição mundial (revisto por Dalrymple *et al.*, 2015).

Atualmente, a malária ainda permanece como um grande problema de saúde pública no mundo, sendo mais prevalente no continente africano, com elevada letalidade em crianças menores de 5 anos de idade, grupo mais vulnerável à doença (revisto por Miller *et al.*, 2013). Uma vez na circulação sanguínea do homem, esses protozoários causam doença clínica com um amplo espectro de morbidade, incluindo anemia, trombocitopenia e inflamação sistêmica, podendo levar a morte devido às complicações renais, pulmonares e/ou cerebrais (revisto por White *et al.*, 2014).

A malária causada pelo *P. vivax* foi, por muito tempo, uma doença negligenciada já que os casos graves eram associados exclusivamente ao *P. falciparum* (Price *et al.*, 2009). No entanto, nos últimos anos, a descrição crescente de casos graves por esta espécie, com evolução para óbito, tem despertado o interesse da comunidade científica em estudar aspectos relacionados à biologia e patogenia decorrente da infecção por esta espécie (revisto por Adams & Mueller, 2017). Porém, a falta de modelos experimentais adequados, como um sistema de cultivo contínuo das formas sanguíneas do parasito, tem

dificultado os estudos sobre a biologia e a interação parasito-hospedeiro na infecção pelo *P. vivax* (revisto por Udomsangpetch *et al.*, 2008; Noulin *et al.*, 2013).

1.2-Epidemiologia da Malária no Mundo e no Brasil

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2018 foi estimado que 3,75 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco para transmissão de malária, que inclui 90 países de diferentes continentes (WHO, 2019). No mesmo ano foram notificados 405.000 óbitos, a maior parte em crianças menores de cinco anos no continente Africano. Estima-se ainda que o investimento para controle e eliminação da malária no mundo tenha somado 2,3 bilhões de dólares em 2018 (WHO, 2019). Todos esses dados demonstram o fardo que esta doença ainda é para a saúde pública mundial.

Do total de casos registrados em 2018, 93% ocorreram na África Subsaariana sendo a maioria deles causados pelo *P. falciparum* (WHO, 2019). Enquanto essa espécie está mais restrita ao continente Africano, o *P. vivax* está presente nos cinco continentes com estimativa de 2,85 bilhões de pessoas residentes em áreas de risco de contrair a infecção (Battle *et al.*, 2012; Gething *et al.*, 2012). Fora da África o *P. vivax* é a espécie mais relevante, sendo predominante nas Américas, onde contribuiu para 75% do total de casos registrados nessa região em 2018 (WHO, 2019). De importância, o *P. vivax* tem reemergido em regiões anteriormente classificadas como livres de malária (Severini *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2009; Bitoh *et al.*, 2011).

No Brasil, o panorama atual da malária tem sido amplamente influenciado por fatores socioeconômicos, sociodemográficos, de políticas e ambientais, resultando em flutuações na transmissão da doença (Sampaio *et al.*, 2015). O país tem uma história centenária de controle à transmissão da malária, todavia ainda está longe de eliminá-la (revisto por Recht *et al.*, 2017). Até 1950 a doença atingia quase todo o território brasileiro com estimativas de 6 milhões de casos por ano em uma população de 50 milhões. Porém, com a campanha Global de Erradicação da Malária, lançada pela OMS, a enfermidade foi praticamente eliminada de toda a área litorânea do país e das bacias das regiões Sul e Nordeste (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Tal campanha combinou o uso de inseticida de efeito residual (DDT) nas habitações com a incorporação do antimalárico cloroquina no sal de cozinha (Pinotti *et al.*, 1955; Da Silva and Hochman, 2011; Silva and Paiva, 2015). Como consequência, em meados da década de 60 a incidência de malária havia reduzido drasticamente no país, sendo registrados em média 53.000 casos por ano, concentrados em pequenos vilarejos da região Amazônica (revisto por Griffing *et al.*, 2015). Por outro lado, este programa de tratamento mundial da OMS foi responsável pela seleção e expansão de parasitos resistentes à cloroquina, particularmente das cepas de *P. falciparum*, que era a espécie predominante na região (Reyes, 1981).

No final de 1970, com os projetos de colonização do INCRA (Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária), ocorreu um intenso movimento migratório para a região Norte do Brasil a fim de colonizá-la (revisto por Brandao *et al.*, 2006). Diversos órgãos governamentais incentivaram a construção de usinas hidroelétricas, o desenvolvimento de projetos agropecuários e de mineração, bem como a construção de

estradas de rodagem. Tal ocupação desordenada resultou em condições de moradia inadequadas para o uso do DDT, em um grande número de imigrantes não imunes e em um ambiente bastante propício para a criação e expansão dos mosquitos vetores devido ao desflorestamento (revisto por Griffing *et al.*, 2015). Tudo isto provocou um aumento considerável na transmissão da malária no início da década de 1980. Naquele ano, registraram-se aproximadamente 170.000 casos, concentrados na Amazônia (97,5%) (revisto por Barata, 1995) mas com surtos fora dessa região (Goiás, Paraná e São Paulo) (Marques *et al.*, 1986; revisto por Barata, 1998).

Na década de 90 a malária atingiu sua maior incidência sendo endêmica na chamada região da Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins). Diante desta grave situação, no ano de 2000 o Ministério da Saúde intensificou suas ações de controle e dois anos após observou-se o maior declínio dos casos de malária dos últimos 40 anos (revisto por Griffing *et al.*, 2015).

Em 2003 os casos continuaram diminuindo, mas nos dois anos subsequentes tornou a crescer, culminando em dezenas de mortes. Até o ano de 2014 houve redução no número de casos de malária no Brasil, com estabilização durante 2015 e 2016. No entanto, em 2017 e 2018 a OMS registrou um aumento nos números de casos e mortes alarmando os órgãos de saúde pública e frisando a fragilidade e instabilidade do programa de controle a malária (revisto por Griffing *et al.*, 2015; WHO, 2018; WHO, 2019).

Atualmente a transmissão da malária é considerada endêmica na Amazônia Legal, onde a doença tem distribuição heterogênea (Figura 1). De relevância, a transmissão zoonótica em áreas de Mata Atlântica tem crescido de importância nos últimos anos (Brasil *et al.*, 2017). Nestas áreas, primatas de pequeno porte têm sido considerados como fontes de infecção para os casos humanos, particularmente envolvendo o *P. simium* (Costa *et al.*, 2014; De Alvarenga *et al.*, 2015).

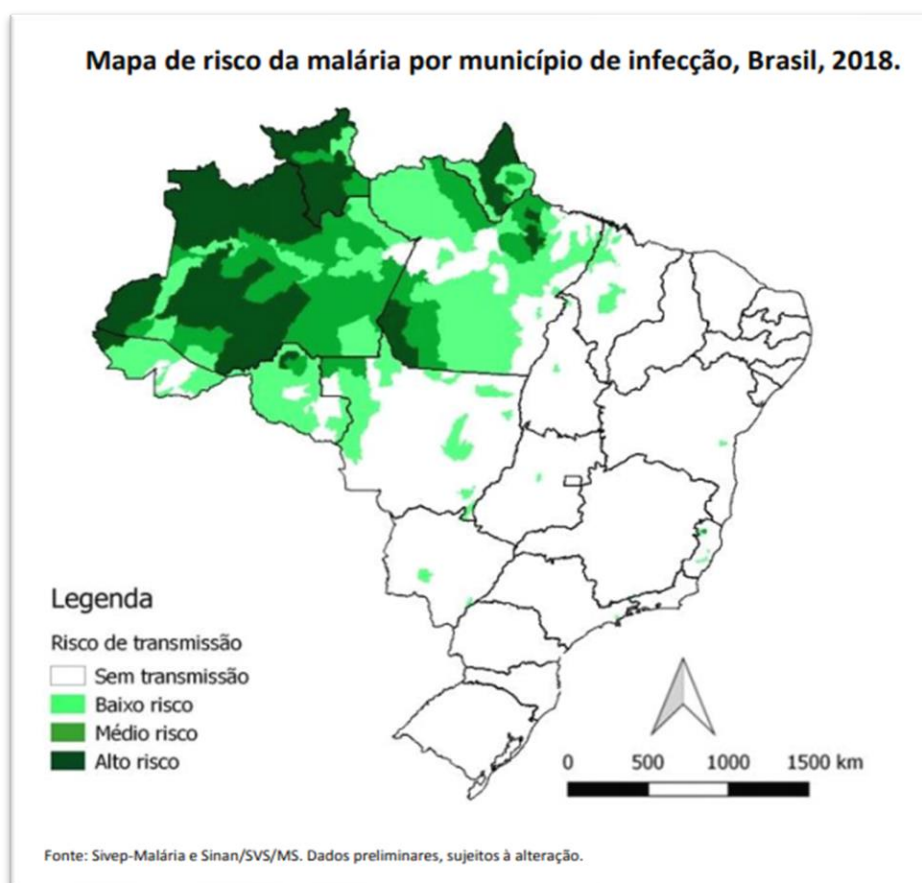


Figura 1. **Mapa de risco da malária, por município, no Brasil, em 2018.** Baixo risco ($\text{IPA} < 10/1000$ habitantes), médio risco ($10,0 \leq \text{IPA} \leq 49,9/1000$ habitantes) e alto risco ($\text{IPA} > 50,0/1000$ habitantes), sendo IPA o Índice Parasitário Anual (número de casos registrados por cada 1000 habitantes de determinada área). **Fonte:** Sinan/ SVS/ MS e Sivep-Malária (<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/31/Mapa-de-risco-da-mal-ria-por-munic--pio-de-infec---o-Brasil-2018-.pdf>).

No que concerne ao *P. vivax*, até 1990 este parasito esteve presente no território nacional em proporções semelhantes ao *P. falciparum* (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). No entanto, com as medidas de controle adotadas pelo Ministério da Saúde, os números de casos de *P. falciparum* diminuíram progressivamente, enquanto aqueles atribuídos ao *P. vivax* aumentaram significativamente. Consequentemente, a partir de 2011 o *P. vivax* passou a ser a espécie predominante no país sendo responsável por mais de 70% das infecções (WHO, 2012). De fato, em 2018 foram reportados no Brasil aproximadamente 169.000 casos de malária por *P. vivax* e apenas 18.000 por *P. falciparum* (WHO, 2019). Este fenômeno, no qual o *P. vivax* se torna mais prevalente que *P. falciparum*, tem sido descrito em outras partes do mundo (revisto por Armistead & Adams, 2018; WHO, 2018), e é decorrente de características biológicas inerentes ao *P. vivax*, como a produção precoce de gametócitos, que limitam as medidas de controle e vigilância da doença.

1.3- Ciclo biológico da malária humana com foco no *P. vivax*

O ciclo biológico dos plasmódios humano é bastante complexo, envolvendo variadas formas morfológicas do parasito em dois hospedeiros: o homem, hospedeiro intermediário, e o mosquito do gênero *Anopheles*, hospedeiro definitivo (Figura 2).

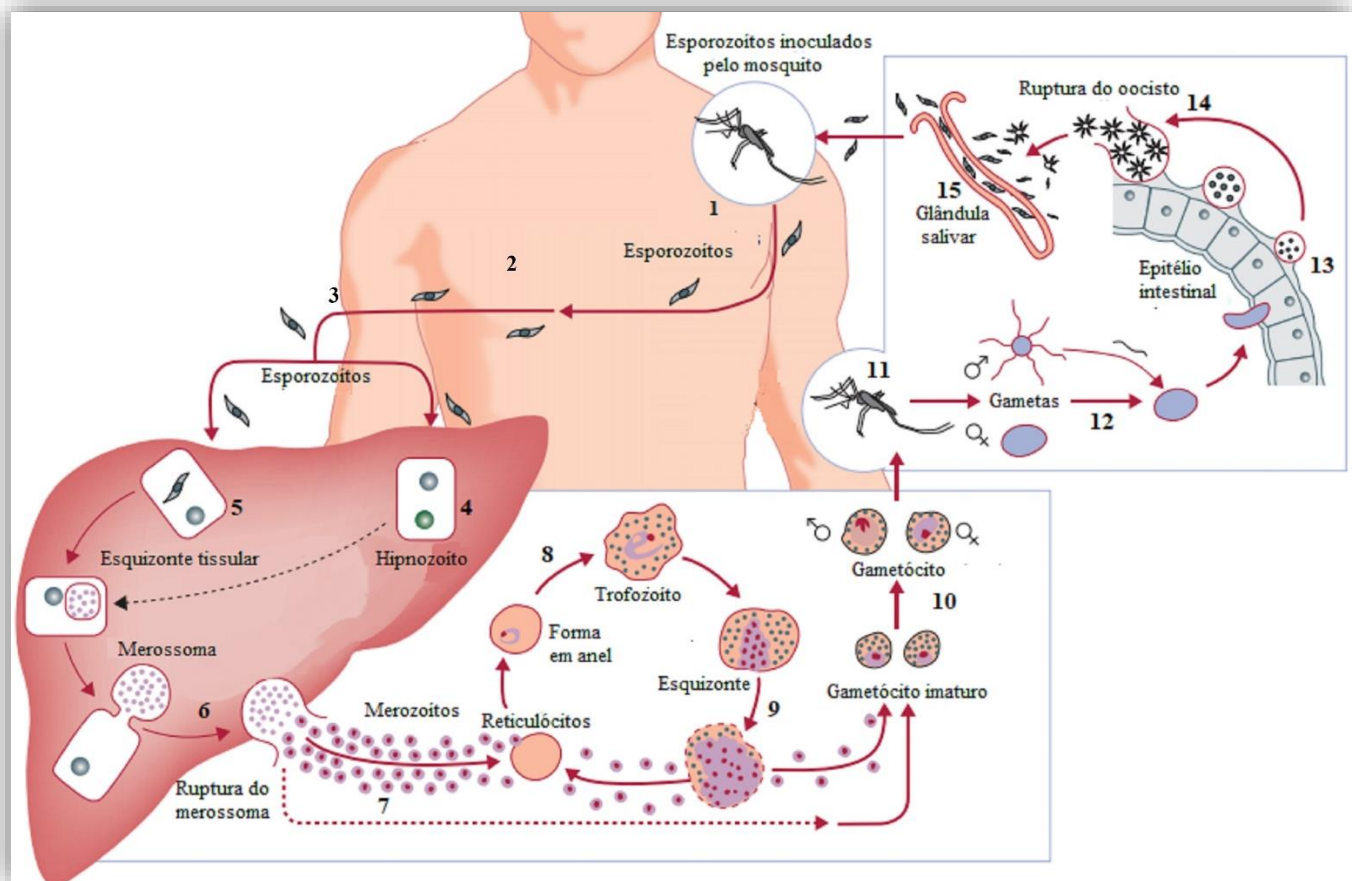


Figura 2. **Esquema ilustrativo do ciclo biológico dos plasmódios, com ênfase no *Plasmodium vivax*.** 1. Inoculação dos esporozoítos no hospedeiro vertebrado através da picada de fêmeas infectadas do mosquito *Anopheles*. 2. Migração dos esporozoítos até os vasos sanguíneos. 3. Chegada dos esporozoítos ao fígado e invasão do hepatócito. No interior do hepatócito os merozoítos podem se desenvolver em: 4. Hipnozoítos, que são formas latentes ou 5. Trofozoítos, esquizontes tissulares e vários merozoítos. 6. Formação do merossoma contendo merozoítos e rompimento dentro dos vasos sanguíneos do fígado. 7. Liberação dos merozoítos e invasão dos reticulócitos. 8. Dentro dos reticulócitos ocorre o desenvolvimento dos merozoítos em anel, trofozoítos e esquizonte. 9. O esquizonte contendo muitos merozoítos rompe a membrana do reticulócito e libera a célula liberando os merozoítos sanguíneos que irão infectar novos reticulócitos. 10. Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos alguns se diferenciam em gametócitos dentro dos reticulócitos. 11. Os gametócitos são as formas infectantes para o mosquito, que ao ingeri-los durante o repasto sanguíneo se infecta. 12. Na membrana peritrófica do mosquito os gametócitos terminam a gametocitogênese e ocorre a fecundação com formação do zigoto. 13. O zigoto encista no epitélio do intestino médio do mosquito sendo denominado de oocisto. 14. O oocisto se rompe liberando esporozoítos infectantes na hemolinfa do mosquito para que atinjam a glândula salivar. 15. Os esporozoítos migram para o ducto da glândula onde serão inoculados no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva, reiniciando o ciclo. **Fonte:** Adaptado de Mueller *et al.*, 2009.

A infecção no homem inicia-se com a picada da fêmea do gênero *Anopheles* infectada. Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas de anofelinos inoculam na pele do hospedeiro os esporozoítos infectantes que estavam no interior de suas glândulas salivares (Figura 2. Tópico 1) (Medica & Sinnis, 2005). Os esporozoítos podem ficar muitos dias nas células epiteliais e, somente aqueles que migram para a corrente sanguínea e alcançam o fígado são capazes de se desenvolver e dar início à fase exo-eritrocítica do ciclo (Amino *et al.*, 2006a; Amino *et al.*, 2006b) (Figura 2. Tópicos 2-3).

Uma vez no fígado, os esporozoítos invadem os hepatócitos e se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos. Os trofozoítos se multiplicam assexuadamente por

esquizogonia, gerando esquizontes tissulares (Figura 2. Tópico 5). Os esquizontes maduros darão origem aos merozoítos, que são as únicas formas capazes de infectar os eritrócitos (revisto por Silvie *et al.*, 2008). A liberação dos merozoítos pré-eritrocíticos do interior dos hepatócitos ocorre através da formação de vesículas denominadas merossomas (Sturm *et al.*, 2006). Essas vesículas são formadas a partir da evaginação da membrana da própria célula e, portanto, não há lise do hepatócito (Figura 2. Tópico 6). Os merossomas atingem o interior dos vasos sanguíneos por diapedese e só então são rompidos, liberando os merozoítos diretamente na circulação sanguínea (Figura 2. Tópico 7). A fase exo-eritrocítica do ciclo tem duração de aproximadamente duas semanas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*. No caso do *P. vivax* e do *P. ovale* alguns esporozoítos podem permanecer em uma forma latente no interior dos hepatócitos, os hipnozoítos, responsáveis pelas recaídas da doença que ocorrem meses ou anos após a infecção inicial (Krotoski, 1985; revisto por Baird *et al.*, 2007) (Figura 2. Tópico 4).

Com o início da fase eritrocítica da malária humana, os merozoíto são capazes de invadir, infectar e multiplicar nos eritrócitos, amplificando assim a infecção com ciclos sucessivos de produção de merozoítos sanguíneos (Figura 2. Tópicos 8-9). Importante ressaltar que o *P. vivax* possui preferência por infectar os reticulócitos, que são eritrócitos jovens. Mais recentemente, foi demonstrado que o *P. vivax* invade preferencialmente reticulócitos com alta expressão do receptor CD71, células ainda predominantes na medula óssea (Malleret *et al.*, 2015). Por outro lado, o *P. falciparum* infecta tanto eritrócitos jovens quanto maduros (Mcqueen & McKenzie, 2004).

O processo de invasão dos eritrócitos pelos merozoítos é bastante específico e ocorre através diferentes etapas: (I) ao encontro com o eritrócito o merozoíto primeiramente adere-se a ele; (II) em seguida o parasito se reorienta, de forma que as organelas do complexo apical tenham contato com a membrana do eritrócito. Tal contato permite (III) a formação da junção móvel que auxilia na interiorização do parasito e, por fim, (IV) ocorre a invasão com formação do vacúolo parasitóforo (revisto por Cowman & Crabb, 2006; revisto por Miller *et al.*, 2013).

As formas sanguíneas são responsáveis pela morbidade da malária, já que a lise dos eritrócitos, juntamente com a liberação dos merozoítos, de produtos do parasito e pigmento malárico (produto da digestão da hemoglobina), leva a inflamação sistêmica e culmina nos principais sintomas clínico da doença, que inclui o paroxismo típico associado a doença (febre e calafrios) (Glushakova *et al.*, 2005).

Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, alguns irão, por mecanismos e estímulos desconhecidos, se desenvolver em gametócitos imaturos e posteriormente em gametócitos maduros, masculinos e femininos (Figura 2. Tópico 10). Os gametócitos são os estágios sexuais do ciclo biológico dos plasmódios e só amadurecem para realizarem a fecundação no interior do sistema digestório do mosquito vetor, onde encontram condições propícias para seu desenvolvimento (revisto por Sinden, 1983).

O ciclo no mosquito tem início quando a fêmea do *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo, ingere gametócitos femininos e masculinos. No intestino médio do mosquito

tem-se o início do ciclo sexuado ou esporogônico, (Figura 2. Tópico **11**) pois com o aumento do pH (Nijhout & Carter, 1978), diminuição da temperatura (Roller & Desser, 1973; Sinden & Croll, 1975) e altos níveis de ácido xanturênico (Billker *et al.*, 1998), os gametócitos finalizam a gametocitogênese. O gametócito feminino se desenvolve, então, em um macrogametócito e o masculino em oito microgametócitos. A fecundação ocorre ainda no intestino médio, aproximadamente 2 horas após a ingestão, gerando o zigoto (revisto por Vlachou *et al.*, 2006). Em 24 horas tem-se o desenvolvimento do zigoto em oocineto que se movimenta por contrações e, dessa forma, atravessa a matriz peritrófica, alcança a parede do intestino médio e encista na camada epitelial passando a ser denominado de oocisto (revisto por Sinden, 2015) (Figura 2. Tópicos **12-13**).

O oocisto, no interior das células epiteliais, se multiplica por esporogonia dando origem aos esporozoítos. Em torno de 9 a 14 dias corridos desde a infecção, ocorre a ruptura da parede do oocisto e liberação dos esporozoítos para a hemolinfa do mosquito. Carreados passivamente pela hemolinfa os esporozoítos chegam até as glândulas salivares, migram para o canal central da glândula e posteriormente para o ducto salivar onde serão inoculados no hospedeiro vertebrado durante o próximo repasto sanguíneo do mosquito reiniciando o ciclo (revisto por Sinden, 2015) (Figura 2. Tópicos **14-15**).

1.3.1- Características biológicas do *P. vivax* e suas implicações no combate à doença

Atualmente, as principais estratégias de controle ao *P. vivax* advêm daquelas já utilizadas contra o *P. falciparum* que se baseiam, principalmente, no diagnóstico oportuno da doença e tratamento dos infectados. No entanto tais medidas não são eficazes contra o *P. vivax* devido a algumas características biológicas particulares como:

- (i) presença de hipnozoítos que podem reiniciar o ciclo sanguíneo sem necessidade de uma nova picada do mosquito *Anopheles*, dificultando a cura do indivíduo (revisto por Baird *et al.*, 2007);
- (ii) dificuldades no tratamento, já que as únicas drogas ativas capazes de matar os hipnozoítos (8-aminoquinolinas) podem induzir hemólise em indivíduos portadores de uma mutação genética que leva à deficiência da enzima G6PD (via glicolítica) (revisto por Beutler *et al.*, 2007);
- (iii) preferência por infectar reticulócitos jovens (CD71⁺) que culmina em baixas parasitemias e consequentemente em dificuldades de detecção do parasito pelo método rotineiro de diagnóstico (microscopia ótica) (revisto por Moreno-Pérez *et al.*, 2013);
- (iv) produção precoce de gametócitos, formas infectantes para o mosquito vetor, que podem estar presentes na corrente sanguínea antes mesmo do início dos sintomas clínicos (revisto por Bassat *et al.*, 2016; revisto por Adapa *et al.*, 2019). Assim, o *P. vivax* tem maior potencial para a transmissão quando comparado ao *P. falciparum* (revisto por Bousema & Drakeley, 2011);

- (v) proporção elevada de infecções subpatentes e assintomáticas, principalmente em áreas de baixa transmissão (Cheng *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2018) como é o caso da Amazônia brasileira (Amaral *et al.*, 2019).

Essas particularidades inerentes ao *P. vivax* que complexificam a utilização dos métodos atuais de combate ao parasito somada aos diversos relatos de resistência do *P. vivax* às drogas antimaláricas e dos vetores aos inseticidas (revisto por Price *et al.*, 2014) demonstra o insucesso progressivo do panorama global de controle e eliminação da malária vivax.

Verifica-se então a urgente necessidade de desenvolvimento e aplicação de medidas de controles específicas contra o *P. vivax* ou que, no mínimo, abranjam as particularidades da espécie. Neste contexto, o desenvolvimento de uma vacina eficaz é uma estratégia relevante, pois pode levar a eliminação da doença em muitas regiões do mundo. Na última década vários grupos de pesquisa vêm se empenhando no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o *P. vivax*, no entanto, ainda não existe um candidato altamente eficiente ou adequado. Enquanto a pesquisa vacinal contra o *P. falciparum* tem progredido bastante, com painéis de grande escala de antígenos sendo testados e um candidato em fase III de triagem clínica, a maioria das vacinas em desenvolvimento contra o *P. vivax* ainda estão em fase pré-clínica ou nas fases iniciais dos ensaios clínicos (revisto por Antonelli *et al.*, 2020).

O estudo das proteínas do *P. vivax* e suas funções é bastante desafiador uma vez que não há um sistema de cultivo contínuo das formas sanguíneas desta espécie, limitando a busca por candidatos vacinais. Neste contexto diferentes abordagens têm sido desenvolvidas para auxiliar no estudo e desenvolvimento de vacinas contra esta espécie.

Em 2008, a partir da publicação do genoma do *P. vivax* por Carlton e colaboradores, os estudos vacinais se intensificaram. Centenas de genes do *P. vivax* foram expressos e bibliotecas de antígenos transcritos e traduzidos foram construídas. Atualmente as bibliotecas são utilizadas para investigar a resposta imune tanto em indivíduos experimentalmente infectados (Arévalo-Herrera *et al.*, 2016), quanto naturalmente expostos ao *P. vivax* (Chen *et al.*, 2010; Chuquiyauri *et al.*, 2015). A presença dessa ferramenta é um impulso significativo para o campo, já que sua aplicação em estudos longitudinais bem desenhados pode levar a identificação de antígenos do *P. vivax* específicos que possam ser associados à proteção.

Nesse sentido, enfoque deve ser dado ao estudo da imunidade naturalmente adquirida pelos indivíduos expostos já que essa imunidade parece ser adquirida mais precocemente no caso do *P. vivax* (revisto por Adams & Muller, 2017).

1.4-Imunidade naturalmente adquirida contra a malária

Imunidade naturalmente adquirida é uma capacidade inerente ao hospedeiro de responder de forma mais eficiente a um patógeno frente a uma ou mais exposição

subsequente ao mesmo patógeno, o que pode levar a uma imunidade protetora. No caso da malária, os estudos têm mostrado que a imunidade adquirida pode levar muitos anos para se desenvolver (revisto por Doolan *et al.*, 2009).

O desenvolvimento da imunidade protetora contra a malária tem sido melhor caracterizado a partir de investigações epidemiológicas realizadas em áreas hiper e holoendêmicas para o *P. falciparum*, onde verificou-se que crianças, gestantes e adultos não-imunes eram mais suscetíveis à doença clínica se comparado aos adultos residentes na mesma área (Koch, 1900; revisto por Marsh & Kinyanjui, 2006; revisto por Anstey *et al.*, 2009). Observou-se também que após sucessivas infecções, as crianças em idade escolar tenderam a desenvolver uma proteção clínica contra os sintomas mais graves da doença embora permanecessem com carga parasitária relativamente alta. Isto evidencia que a imunidade contra os sintomas, isto é, imunidade denominada “anti-tóxica” se desenvolve antes da imunidade parasito-específica, que é responsável pela redução dos níveis parasitários (revisto por Ademolue & Awandare, 2018). Presume-se então que a exposição continuada ao parasito seja através de novas infecções ou recorrências ao longo dos anos leva a uma imunidade protetora contra o parasito capaz de reduzir os níveis parasitários (revisto por Marsh & Kinyanjui, 2006; Stanisic *et al.*, 2015). Esta imunidade é parcial e depende da exposição continua ao parasito nas áreas de transmissão (revisto por Ademolue & Awandare, 2018).

De maneira geral, a racional da pesquisa de vacinas contra a malária se baseia nas evidências bem estabelecidas de que o indivíduo desenvolve imunidade protetora contra a doença clínica após longo tempo de exposição à transmissão (revisto por Vijayan & Chitnis, 2019). Assim, para o desenvolvimento de vacinas que possam ser eficazes, faz-se necessário conhecer os antígenos e mecanismos envolvidos na proteção contra a malária. No entanto, tal conhecimento é ainda bastante limitado no que concerne ao *P. vivax*, principalmente por esta espécie ter sido negligenciada por muitos anos. Como resultado, a maioria dos estudos sobre mecanismos imunes protetores foram descritos para o *P. falciparum* ou em modelos experimentais. Embora pareça razoável supor que os princípios-chave da imunidade contra *P. falciparum* também se apliquem ao *P. vivax*, as diferenças biológicas significativas entre as duas espécies requerem cautela já que os mecanismos específicos podem diferir entre estas espécies.

Evidências mais recentes confirmam que em áreas hiperendêmicas o *P. vivax* também induz imunidade clínica (Genton *et al.*, 2008; França *et al.*, 2016a; França *et al.*, 2016b). De fato, estudos clássicos de malarioterapia já indicavam que a imunidade protetora contra o *P. vivax* é adquirida mais rapidamente que aquela induzida pelo *P. falciparum* (Cohen *et al.*, 1961; Cohen *et al.*, 1969). Apesar das razões para esta diferença no padrão de imunidade não serem conhecidas, especula-se que no caso do *P. vivax* aquelas particularidades, como a maior frequência de infecções com baixas parasitemias (subpatentes) e presença de recaídas pelas formas latentes do fígado (hipnozoítos), poderiam contribuir para a relativamente rápida aquisição da imunidade (revisto por Mueller *et al.*, 2013).

Mesmo em áreas de baixa endemicidade, onde a transmissão é instável, como é o caso da Região Amazônica, existem evidências da aquisição da imunidade naturalmente adquirida pela população, particularmente pelo *P. vivax*, espécie mais prevalente na região (Ladeia-Andrade *et al.*, 2009; Souza-Silva *et al.*, 2010). Nestas áreas, os autores demonstraram que a imunidade protetora poderia ser evidenciada pela diminuição de infecções sintomáticas em função do tempo de residência dos indivíduos na Amazônia brasileira, indicando o desenvolvimento de algum grau de imunidade clínica.

Embora os mecanismos imunes que conferem proteção clínica ao indivíduo não estejam totalmente esclarecidos, os anticorpos contra as formas sanguíneas parecem ter papel crucial, particularmente, os anticorpos neutralizantes, isto é, que impedem a invasão do *P. falciparum* nos eritrócitos (Healer *et al.*, 2019) ou do *P. vivax* em reticulócitos (Michon *et al.*, 2000).

1.4.1. -Papel dos anticorpos na resposta imune contra a malária

Como os eritrócitos não expressam MHC de classe I ou II - que poderiam levar ao reconhecimento das células infectadas pela imunidade inata ou pela resposta imune adaptativa de células T - a imunidade contra as formas sanguíneas dos plasmódios é majoritariamente mediada pelos anticorpos (revisto por Hill *et al.*, 2017). As evidências do papel fundamental dos anticorpos na proteção clínica vêm de experimentos clássicos de malarioterapia onde imunoglobulinas eram transferidas de adultos hiper imunes para crianças acarretando na proteção desta contra a infecção e/ou redução do risco de evolução da doença (Cohen *et al.*, 1961; Cohen *et al.*, 1969). Diversos estudos soroepidemiológicos posteriores confirmaram tais evidências (Sabchareon *et al.*, 1991; revisto por Dobbs & Dent, 2016).

Os anticorpos específicos naturalmente adquiridos durante as infecções maláricas são, predominantemente, do isótipo IgG e IgM e podem ser direcionados: **(i)** contra os antígenos dos esporozoítos (fase exo-eritrocítica) (revisto por Julien & Wardemann, 2019); **(ii)** contra antígenos dos merozoítos (fase eritrocítica) (revisto por Fowkes *et al.*, 2010) e, **(iii)** contra antígenos presentes na membrana dos eritrócitos/reticulócitos parasitados (fase eritrocítica) (Bull *et al.*, 1998). Os anticorpos que atuam contra os merozoítos são relevantes e amplamente estudados, já que podem impedir a invasão dos eritrócitos, inibindo o ciclo sanguíneo, responsável pela morbidade da doença. Nesse sentido sabe-se que tanto as proteínas de superfície dos merozoítos quanto aquelas liberadas do interior das organelas apicais, como é o caso de roptrias e micronemas, são alvos desses anticorpos, incluindo os anticorpos neutralizantes ou bloqueadores da interação parasito-célula hospedeira (revisto por Beeson *et al.*, 2016).

1.4.1.1. Resposta de anticorpos IgG contra as formas sanguíneas dos parasitos da malária

Tanto nas infecções pelo *P. vivax*, quanto pelo *P. falciparum*, observa-se que a maioria dos anticorpos naturalmente adquiridos contra os antígenos do merozoíto são do isotipo IgG, das subclasses IgG1 e IgG3 (revisto por Cutts *et al.*, 2014; revisto por Beeson *et al.*, 2016). De relevância, essas subclasses possuem a região Fc com alta afinidade por

receptores FcR de diferentes células fagocíticas do sistema imune, além de se ligarem fortemente aos componentes do Sistema do Complemento. Portanto, a opsonização dos merozoítos pelos anticorpos IgG1 ou IgG3 poderia estimular a fagocitose e o Sistema do Complemento para atuar na eliminação do parasito. De fato, diversos trabalhos têm demonstrado a importância de tais mecanismos para a proteção clínica contra a malária (revisto por Hill *et al.*, 2017).

Nas infecções pelo *P. falciparum* a via clássica do sistema do complemento é ativada logo após a opsonização, levando à lise do merozoíto ou inibindo a invasão ao eritrócito diretamente (Boyle *et al.*, 2015). A opsonização potencializa a função do Sistema do Complemento já que na ausência dos anticorpos IgG1 ou IgG3 específicos a deposição dos componentes deste sistema na superfície do merozoíto é limitada à presença de fatores regulatórios e, portanto, mais lenta (Boyle *et al.*, 2015; Kennedy *et al.*, 2016; Rosa *et al.*, 2016). Recentemente foi observado que nas infecções pelo *P. vivax* também ocorre uma ativação precoce do sistema do complemento quando o merozoíto é opsonizado por IgG1 e IgG3 anti-MSP (Merozoite Surface Protein) (Vallejo *et al.*, 2018; Oyong *et al.*, 2019).

Além da ativação rápida do sistema do complemento, os anticorpos opsonizantes podem se ligar aos receptores de IgG (FcγRI, FcγRIIa e FcγRIII) nos fagócitos como macrófagos, monócitos e neutrófilos podendo resultar em diferentes mecanismos de destruição parasitária (revisto por Hill *et al.*, 2017) como a seguir:

(i) Fagocitose de eritrócitos parasitados e/ou dos merozoítos, cujos estudos estão bem caracterizados em *P. falciparum* (Trubowitz & Masek, 1968; Hill *et al.*, 2013; Osier *et al.*, 2014; Kana *et al.*, 2017). No caso do *P. vivax*, o estudo da eritrofagocitose ainda é um desafio devido à ausência do sistema de cultivo *in vitro* do parasito. Consequentemente, os dados ainda são contraditórios e pouco se sabe sobre a real contribuição deste mecanismo para o controle da doença (Antonelli *et al.*, 2014; Saha *et al.*, 2016). Recentemente, um novo ensaio de fagocitose *ex vivo* por citometria de fluxo para merozoítos de *P. vivax* tem sido proposto (Farias *et al.*, 2019) e poderá ser utilizado em estudos futuros. Espera-se que sua contribuição na malária por *P. vivax* possa ser elucidada em curto e médio período de tempo.

(ii) Inibição celular dependente de anticorpo (Antibody-Dependent Cellular Inhibition – ADCI) e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity-ADCC). Após a ligação entre o anticorpo IgG opsonizador e o receptor FcR das células efetoras – isto é, monócitos para ADCI e células NK para ADCC - ocorre a liberação de inibidores solúveis e/ou fatores citotóxicos que impedem o desenvolvimento parasitário (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990; Chimmia *et al.*, 2009). O ADCI tem sido bem descrito nas infecções pelo *P. falciparum* (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990), enquanto o ADCC tem sido mais estudado só recentemente (Arora *et al.*, 2018; Hart *et al.*, 2019).

(iii) Estresse oxidativo. Apesar deste mecanismo contribuir para a morte do parasito (Gyan *et al.*, 1994; Kapelski *et al.*, 2014), tem sido questionado a sua relevância

no controle da malária (revisto por Hill *et al.*, 2017). Após o encontro com o merozoíto opsonizado de *P. falciparum*, os neutrófilos, de fato, produzem mais espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), seus intermediários e outros componentes tóxicos (Kumaratilake & Ferrante, 1992). No entanto tal mecanismo somente se correlaciona com proteção clínica se associado ao ADCI (Joos *et al.*, 2010; Murungi *et al.*, 2016). Em relação às infecções pelo *P. vivax*, a infecção inicial leva a queda nas populações de neutrófilos (mecanismo de evasão imune) (Vallejo *et al.*, 2018), portanto o estresse respiratório mediado por anticorpos e neutrófilos pode não ser um mecanismo tão eficiente contra esta espécie.

É importante ressaltar que todos esses mecanismos ocorrem simultaneamente no hospedeiro a fim de combater a infecção, todavia, como os estudos os investigam separadamente é difícil saber a real contribuição de cada um na imunidade clínica. Além disto, de grande interesse têm sido os anticorpos neutralizantes, isto é, aqueles capazes de bloquear a invasão da célula hospedeira, já que os mesmos podem estar associados à proteção clínica (revisto por Beeson *et al.*, 2016; Urusova *et al.*, 2019).

Tem sido observado que alguns anticorpos IgGs específicos contra determinados antígenos do *Plasmodium* podem bloquear a invasão dos merozoítos aos eritrócitos e consequentemente atuar diretamente no controle da parasitemia (Cohen *et al.*, 1969; O'donnell *et al.*, 2001). Tais anticorpos, denominados anticorpos neutralizantes e/ou inibitórios (Binding Inhibitory Antibodies – BIABs), têm se mostrado promissores para os estudos vacinais que buscam bloquear a interação ligante-receptor (King *et al.*, 2008). Enquanto para o *P. falciparum* os ensaios inibitórios *in vitro* estão bem estabelecidos, já que as formas sanguíneas deste parasito têm sido mantidas em cultura continua desde 1976 (Trager & Jensen, 1976), os ensaios *in vitro* com *P. vivax* têm sido mais complicados. A falta de cultura continua das formas sanguíneas do parasito tem limitado estes ensaios, que são atualmente restritos a poucos grupos de pesquisa. Consequentemente, métodos indiretos têm sido mais utilizados como é o caso da expressão do ligante de interesse em superfície de células transfectáveis (Shakri *et al.*, 2012). Estes ensaios tem possibilitado a pesquisa de anticorpos com atividade BIABs, o que poderá acelerar o processo de descobrimento de vacinas contra as formas sanguíneas do *P. vivax*.

1.4.1.2- Resposta de anticorpos IgM contra as formas sanguíneas dos parasitos da malária

Embora na malária a resposta de anticorpos IgG tem sido historicamente bem caracterizada, achados recentes sugerem que os anticorpos IgM podem ser relevantes inclusive para o desenvolvimento de vacinas (Boyle *et al.*, 2019; Boonyaratankornkit & Taylor, 2019). Até o momento, os poucos estudos conduzidos sobre o papel de IgM na resposta imune de malária têm sido focados principalmente na infecção por *P. falciparum*, portanto, raros são os estudos que investigaram anticorpos IgM durante as infecções pelo *P. vivax*. Apesar disto, níveis relativamente elevados de anticorpos IgM específicos contra diferentes antígenos de ambas espécies têm sido relatados em diversas populações residentes em áreas de transmissão (Dodoo *et al.*, 2008; Richards *et al.*, 2010; Adu *et al.*,

2016), incluindo o Brasil (Riccio *et al.*, 2013; Figueiredo *et al.*, 2017; Bittencourt *et al.*, 2018).

No que se refere aos mecanismos de proteção envolvendo anticorpos IgM na malária, a maior parte dos dados diz respeito a malária experimental em modelo murino (Couper *et al.*, 2005; Borges Da Silva *et al.*, 2018). Por outro lado, anticorpos IgM não específicos para antígenos dos plasmódios, mas dirigidos contra epítomos a-galactosil de bactérias da microbiota intestinal, têm sido correlacionados com proteção contra malária por *P. falciparum* (Yilmaz *et al.*, 2014; Aguilar *et al.*, 2018). Níveis elevados desses anticorpos foram recentemente descritos nas infecções pelo *P. vivax* no Brasil, mas sem nenhuma correlação com proteção clínica (Coelho *et al.*, 2019).

Em relação aos anticorpos IgM específicos contra antígenos do *P. falciparum* em populações africanas, a intensidade e amplitude desses anticorpos foram associados com resistência genética à infecção (Arama *et al.*, 2015). Além disso, um estudo recente demonstrou que indivíduos que sobreviveram à malária cerebral apresentavam níveis maiores de IgM contra merozoítos do *P. falciparum* quando comparado aos que não sobreviveram (Mbengue *et al.*, 2019), sugerindo que estes anticorpos podem ser críticos no mecanismo de proteção.

Recentemente, Boyle e colaboradores (2018) demonstraram que anticorpos IgM naturalmente adquiridos contra o *P. falciparum* podem ativar o Sistema do Complemento (via clássica) *in vitro* levando à lise do parasito, e bloqueando, portanto, a progressão da infecção de eritrócitos. De fato, estima-se que os anticorpos IgM são bastante efetivos como ativador do sistema do complemento, sendo necessária apenas uma única molécula de IgM para lisar um eritrócito, enquanto que, para o mesmo efeito, são necessárias 100 moléculas de IgG (Cooper, 1985; Carroll, 2004). Boyle e colaboradores (2018) demonstraram ainda que os níveis de IgM específicos se correlacionaram com a proteção clínica nas crianças expostas à transmissão em áreas hiperendêmicas.

1.4.1.3- Novo paradigma para a imunidade humoral baseado na resposta de anticorpos IgM de alta especificidade

Classicamente, após primeiro contato com o antígeno ocorre uma rápida elevação nos níveis de anticorpos IgM (de baixa especificidade) no soro do indivíduo, que declinam rapidamente (3 a 4 semanas), sendo substituídos pelos anticorpos IgG (de alta afinidade) que permanecem com níveis elevados por várias semanas (Figura 3a). Após o segundo encontro com o mesmo antígeno observa-se que ocorre um “booster” nos níveis de IgG, sendo que esses anticorpos predominam na resposta secundária e são responsáveis pela memória imunológica. Em função deste conceito tradicional, aqueles indivíduos com altos níveis de IgM antígeno-específico no soro consistem, provavelmente, em portadores de infecções agudas, pois durante a fase crônica da infecção o isótipo predominante seria IgG. Este paradigma de indução precoce de IgM de baixa afinidade seguida pela conversão em anticorpos IgG de alta afinidade tem sido historicamente aceito para as respostas humanas contra diferentes agentes infecciosos (revisto por Guzman *et al.*, 2010; revisto por Busch *et al.*, 2008; Tomaras *et al.*, 2008).

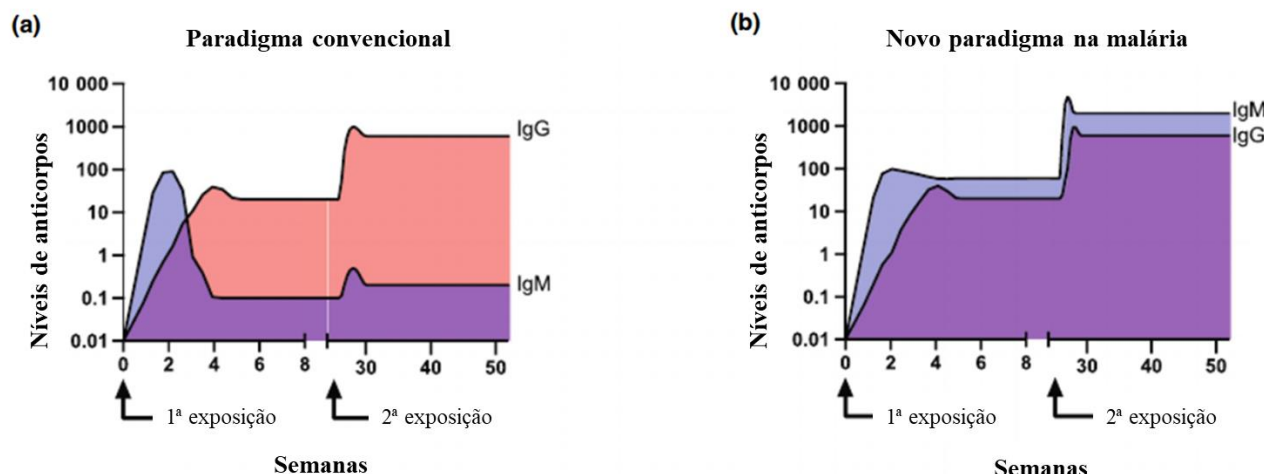


Figura 3. **Modelos propostos para a resposta de anticorpos IgM e IgG contra a malária.** (a) No paradigma convencional, os níveis de anticorpos IgM específicos mas de baixa afinidade contra o *Plasmodium* aumentam e declinam em até 4 semanas durante a resposta primária, sendo basais na resposta secundária e, os anticorpos IgG, que atingem o pico por volta da 4ª semana são responsáveis pela imunidade de longa-duração (alta afinidade). (b) Em um novo paradigma de imunidade contra a malária, a resposta dos anticorpos IgM de alta afinidade, assim como a de IgG, é sustentada e participa da imunidade de longa duração. **Fonte:** Adaptado de Boonyaratankornkit & Taylor, 2019.

No entanto, achados recentes têm sugerido que os anticorpos IgM podem sofrer hipermutação somática, tornando-se altamente específicos e levando ao desenvolvimento de resposta imune de vida longa (Bohannon *et al.*, 2016). Achados semelhantes foram descritos para a malária murina (Krishnamurthy *et al.*, 2016). Estes dados têm sido reforçados por estudos de cinética de anticorpos IgM/IgG em populações expostas ao *P. falciparum* (Boyle *et al.*, 2019), levando a proposição de que anticorpos IgM de alta afinidade podem exibir uma cinética similar à de anticorpos IgG em infecções subsequentes (Figura 3b). Em relação ao *P. vivax*, embora os dados ainda sejam escassos, um estudo recente demonstrou a presença de IgM específico contra merozoítos por cerca de 30 dias após o tratamento e eliminação do parasito (Patgaonkar *et al.*, 2018).

Em conjunto, todos estes dados apontam a importância de esclarecimentos sobre a resposta de anticorpos IgM antígeno-específica na malária, particularmente, para o desenvolvimento de vacinas contra o *P. vivax*, espécie predominante na Amazônia brasileira.

1.5-Antígenos alvo para o desenvolvimento de vacinas contra as formas sanguíneas do *P. vivax*

De maneira geral, os anticorpos IgG e, possivelmente IgM, contra as proteínas de formas sanguíneas dos parasitos da malária podem mediar a imunidade naturalmente adquirida (revisto por Mueller *et al.*, 2013; Boyle *et al.*, 2019). No caso do *P. vivax*, as proteínas localizadas em organelas apicais e/ou superfície dos merozoítos têm sido alvos para o desenvolvimento de vacinas contra o parasito (revisto por López *et al.*, 2017).

Diferentes proteínas dos merozoítos têm sido estudadas, principalmente aquelas localizadas nas organelas apicais que participam do processo de invasão das células hospedeira (revisto por Patarroyo *et al.*, 2020). Entre os principais antígenos candidatos à vacina incluem a *Duffy binding protein* (DBP) que está envolvida na invasão dos reticulócitos (item 1.5.2) e a principal proteína de superfície dos merozoítos (MSP-1) (item 1.5.1).

1.5.1- Proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP-1)

Entre as proteínas de formas sanguíneas do *P. vivax* que têm se mostrado bastante promissoras nos estudos de protótipos vacinais inclui a família das proteínas de superfície de merozoíto (Merozoite Surface Protein – MSP) (revisto por López *et al.*, 2017). A família MSP é composta por diversas proteínas de superfície do merozoíto, dentre elas as MSP-1, MSP-9 e MSP-3. Embora todas estas proteínas tenham sido estudadas do ponto de vista da imunidade naturalmente adquirida, a MSP-1 é a que foi melhor caracterizada tanto para o *P. vivax* quanto para o *P. falciparum* (Wang *et al.*, 2016).

A MSP-1 é uma proteína de membrana presente durante todo o ciclo eritrocítico. Essa proteína é sintetizada a partir de um precursor de alto peso molecular (aproximadamente 200-kDa), que é processado em vários fragmentos (83, 30, 38 e 42kDa) (Blackman *et al.*, 1990). Durante a invasão do eritrócito, o fragmento C-terminal de 42-kDa (MSP-1₄₂) é clivado em dois sub-fragmentos: 33-kDa (MSP-1₃₃) e 19-kDa (MSP-1₁₉) (Stafford *et al.*, 1994). Apenas a MSP-1₁₉ permanece na superfície do merozoíto, aderida através de uma ancora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) no momento da invasão (Blackman *et al.*, 1990; Gerold *et al.*, 1996). Dessa forma, a MSP-1₁₉ é transportada para dentro dos eritrócitos e permanece ligada ao trofozoíto jovem recém-formado (Freeman & Holder, 1983; Galinski *et al.*, 1992; Holder *et al.*, 1992; Nogueira *et al.*, 2006). Alguns estudos demonstraram ainda que a MSP-1₁₉ é composta de dois domínios de fatores de crescimento epidermal (Epidermal Growth factor – EGF) bastante imunogênicos na infecção natural em humanos (Holder *et al.*, 1992; Soares *et al.*, 1999). De importância ainda, os dois domínios de EGF interagem com os eritrócitos tendo papel crítico na invasão dos mesmos (Morgan *et al.*, 1999; Boyle *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2017).

Estudos de vacinação em camundongos com a MSP-1₁₉ demonstraram que já na segunda imunização os títulos de anticorpos nos soros dos camundongos contra esse fragmento aumentavam consideravelmente (Kaslow & Kumar, 1996; Cunha *et al.*, 2001; Soares and Rodrigues, 2002). Estudos realizados em indivíduos residentes das áreas endêmicas do Brasil observaram que a resposta de anticorpos contra a MSP-1₁₉ aumenta em função da exposição (Soares *et al.*, 1997; Ladeia-Andrade *et al.*, 2007; Fernandez-Becerra *et al.*, 2010; Storti-Melo *et al.*, 2011) e que essa proteína é bastante imunogênica nos indivíduos naturalmente expostos ao *P. vivax* (Soares *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2003; Morais *et al.*, 2005; Barbedo *et al.*, 2007; Bastos *et al.*, 2007; Mourão *et al.*, 2012; Riccio *et al.*, 2013).

Diversos outros estudos foram conduzidos com a MSP-1₁₉ em outras áreas com transmissão do *P. vivax* ao redor do globo e em todos foi possível confirmar a elevada

imunogenicidade da proteína (Ak *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2001; Valderrama-Aguirre *et al.*, 2005; Pitabut *et al.*, 2007; Wickramarachchi *et al.*, 2007; Zeyrek *et al.*, 2008; Mehrizi *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2015).

Embora muitos estudos tenham demonstrado que a exposição contínua à malária induz níveis elevados de anticorpos contra a MSP-1₁₉, poucos estudos associaram estes anticorpos à imunidade protetora (Freeman & Holder, 1983; Galinski *et al.*, 1992; Holder *et al.*, 1992; Nogueira *et al.*, 2006).

1.5.2- Proteína de ligação ao grupo sanguíneo Duffy do *Plasmodium vivax* (DBP)

Baseado no mecanismo de indução de anticorpos inibitórios IgGs (BIAbs) acredita-se que o desenvolvimento de vacina contra as formas sanguíneas do *P. vivax* possa ser mais viável. Isto porque o parasito apresenta uma característica biológica particular que restringe o processo de invasão aos reticulócitos. Mais especificamente, a invasão do *P. vivax* é altamente dependente de um antígeno de grupo sanguíneo presente na superfície dos reticulócitos – Duffy receptor para quimiocinas (Duffy Antigen/Receptor for Chemokines - DARC) (Miller *et al.*, 1976) - que se liga a proteína do parasito denominada *Duffy Binding Protein* (DBP) (Adams *et al.*, 1990). Como a interação DBP-DARC é a principal via de invasão aos reticulócitos conhecida, os BIAbs direcionados contra a DBP ao bloquear a invasão da célula hospedeira podem impedir a evolução da infecção (Michon *et al.*, 2000; Grimberg *et al.*, 2007; Ceravolo *et al.*, 2008; King *et al.*, 2008; Souza-Silva *et al.*, 2010; Chootong *et al.*, 2012). Dessa forma a infecção por *P. vivax* pode ser controlada de maneira mais eficaz do que pelo *P. falciparum*, onde existem outras vias de invasão bem conhecidas (revisto por Cowman *et al.*, 2012; revisto por Cowman *et al.*, 2017).

A proteína DBP, portanto, é a chave para o processo de invasão e um dos principais antígenos candidatos ao desenvolvimento de uma vacina contra a malária vivax (Singh *et al.*, 2018). A natureza vital da interação DBP-DARC é evidente pela baixa prevalência de *P. vivax* em áreas onde as populações são Duffy negativas, isto é, caracterizadas pela ausência do receptor DARC eritrocítico, como visto no Oeste da África (Miller *et al.*, 1976). Apesar de estudos recentes confirmarem a ocorrência de infecções por *P. vivax* em indivíduos DARC-negativos, isso parece ocorrer mais frequentemente em algumas regiões específicas (Cavasini *et al.*, 2006; Ménard *et al.*, 2010; Wurtz *et al.*, 2011). Embora sejam desconhecidas as vias de invasão envolvidas na infecção de eritrócitos DARC-negativos, o *P. vivax* parece ter evoluído de forma a utilizar outros ligantes parálogos da DBP (Ntumngia *et al.*, 2016).

A DBP tem peso de aproximadamente 140kDa e é localizada em organelas apicais do merozoíto de *P. vivax* denominadas micronemas. A exteriorização da DBP ocorre somente momentos antes da invasão para que interaja com seu receptor cognato DARC presente na membrana do reticulócitos (Adams *et al.*, 1990; Adams *et al.*, 1992). Recentemente a estrutura cristalizada da DBP foi elucidada e um modelo de ligação ao DARC foi proposto (Figura 4A). Neste modelo, a ligação DBP-DARC ocorre através da dimerização da DBP, sendo que o dímero se liga, inicialmente, a apenas uma molécula

de DARC, mas em seguida recruta outra, formando um heterotetrâmero estável (Batchelor *et al.*, 2011). A DBP possui 6 regiões (I-VI) de domínios extracelulares (Figura 4B). A última região possui um domínio citoplasmático e um domínio que atravessa a membrana da célula. O domínio rico em cisteína compreende as regiões II a VI. Na região II da proteína localiza-se o domínio da ligação funcional ao receptor DARC. A região II da DBP é composta por 330 aminoácidos e caracterizada por um domínio de 12 resíduos de cisteínas conservados onde foi mapeado o sítio de ligação DBP-DARC (Chitnis & Miller, 1994; Chitnis *et al.*, 1996). Tal domínio está localizado em um segmento de aproximadamente 170 aminoácidos entre as cisteínas 4 e 7 da região II (Ranjan & Chitnis, 1999; Vanbuskirk *et al.*, 2004; Sampath *et al.*, 2013).

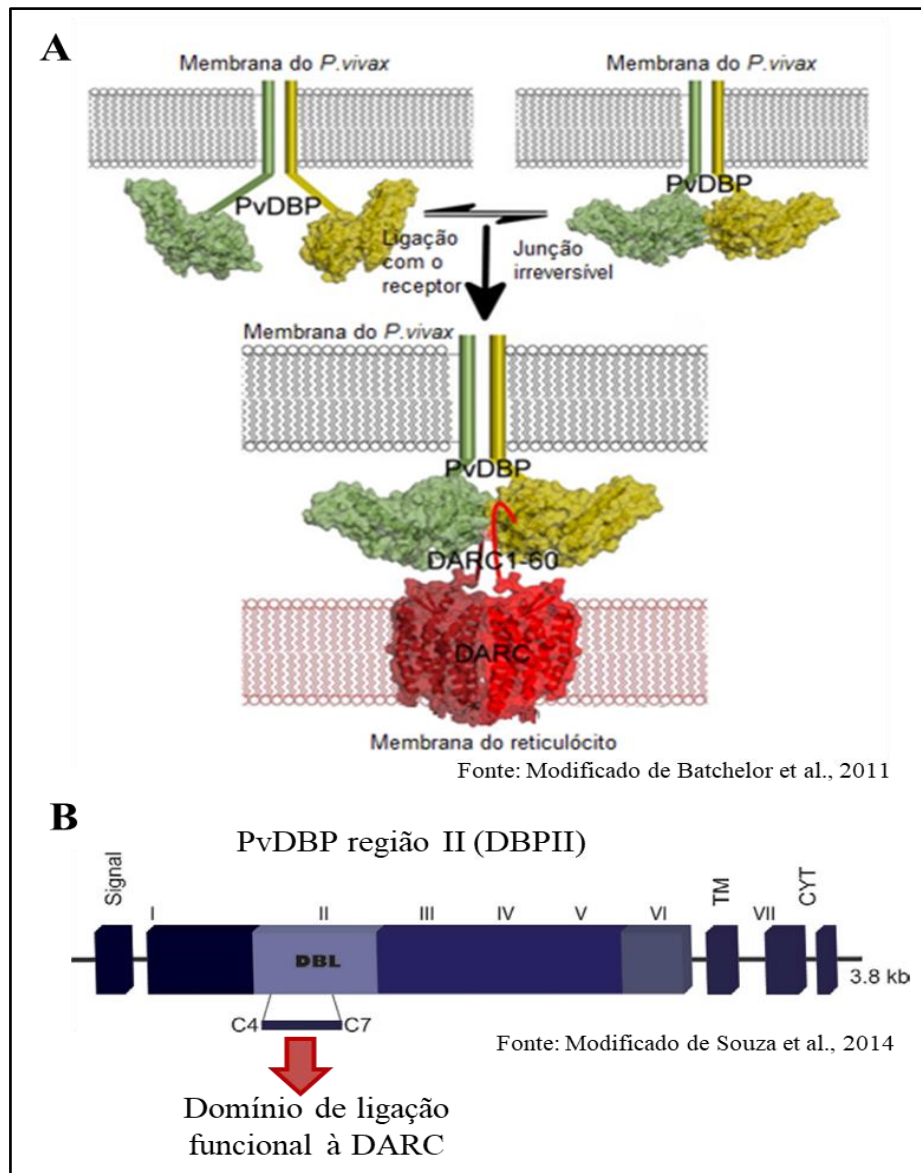


Figura 4. **Proteína de ligação ao grupo Duffy do *Plasmodium vivax* (PvDBP).** **A** Modelo de ligação da DBP à DARC. A DBP é expressa na membrana do *P. vivax* pouco antes da invasão. O dímero (verde e amarelo) de DBP reconhece e se liga ao dímero de DARC (vinho e vermelho) formando um heterotetrâmero (Modificado de Batchelor *et al.*, 2011). **B** Representação esquemática dos domínios estruturais da DBP. A proteína possui seis regiões de domínios extracelulares (I-VI) e uma região (VII) de domínio citoplasmático (DC) e transmembrana (TM). Na região II encontra-se o domínio de ligação funcional de DBP-DARC. **Fonte:** Adaptado de Souza-Silva *et al.*, 2014.

Com o objetivo de conhecer a capacidade antigênica e imunogênica da proteína candidata à vacina, estudos sobre a resposta imune contra a DBPII têm sido conduzidos em populações expostas à transmissão (revisto por Longley *et al.*, 2016). Os estudos iniciais demonstraram que indivíduos naturalmente expostos à malária produziam anticorpos IgGs contra a região II da DBP (Fraser *et al.*, 1997). Posteriormente, muitos relatos do desenvolvimento desses anticorpos foram documentados em populações de

diferentes regiões endêmicas (Cole-Tobian *et al.*, 2002; Suh *et al.*, 2003; Tran *et al.*, 2005; Barbedo *et al.*, 2007; Zakeri *et al.*, 2011; Valizadeh *et al.*, 2014).

Nos últimos 10 anos, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo um trabalho pioneiro que visa caracterizar a resposta imune a DBPII em regiões da Amazônia brasileira (De Sousa *et al.*, 2014). Os resultados permitiram demonstrar que indivíduos naturalmente expostos à malária na Amazônia brasileira desenvolvem anticorpos IgG contra DBPII, sendo a prevalência destes anticorpos em função do tempo de exposição do indivíduo nas áreas de transmissão (Cerávolo *et al.*, 2005). De fato, foi possível demonstrar que cada ano de exposição aumentou em 2% a chance do indivíduo desenvolver anticorpos contra a DBPII (Sousa *et al.*, 2010). De relevância, parte destes anticorpos foi capaz de bloquear a interação ligante-receptor (BIAbs) (Sousa *et al.*, 2010). Em concordância com estes achados, a presença dos BIAbs já foi descrita em várias regiões endêmicas para *P. vivax* no mundo (Michon *et al.*, 2000; Grimberg *et al.*, 2007; Ceravolo *et al.*, 2008; King *et al.*, 2008; Souza-Silva *et al.*, 2010; Chootong *et al.*, 2012; Nicolette *et al.*, 2016).

Embora os BIAbs com alta capacidade bloqueadora da interação DBPII-DARC já tenham sido associados à proteção clínica contra a doença (Cole-Tobian *et al.*, 2009; King *et al.*, 2008; Nicolette *et al.*, 2016), poucos indivíduos parecem desenvolver estes anticorpos neutralizantes (Kano *et al.*, 2016). A ausência dos BIAbs contra DBPII em grande parte das populações naturalmente expostas pode ser explicada, em parte, pelo fato dessa proteína ser exposta ao sistema imune somente no momento da invasão dos reticulócitos (Adams *et al.*, 1990) e pelo elevado polimorfismo na região do ligante (Nóbrega De Sousa *et al.*, 2011), o que pode levar com frequência a indução de anticorpos cepa-específicos (revisto por Mueller *et al.*, 2013; Souza-Silva *et al.*, 2014). Neste contexto, a ocorrência de um surto de transmissão autóctone na região metropolitana de Belo Horizonte, MG (área não endêmica), permitiu confirmar pela primeira vez que os BIAbs são cepa-específicos (Ceravolo *et al.*, 2009). Estes dados foram posteriormente confirmados por outros grupos de pesquisa (Cole-Tobian *et al.*, 2009; Maestre *et al.*, 2010; Chootong *et al.*, 2012).

Os polimorfismos da região II da DBP podem representar um grande desafio ao comprometer a eficácia da vacina contra diferentes cepas de *P. vivax*. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa analisou globalmente a variabilidade genética da DBPII e demonstrou grande diversidade entre os isolados geográficos de DBPII (Sousa *et al.*, 2010). As análises permitiram concluir que para cobrir 60% das sequências de DBPII identificadas ao redor do mundo seria necessário uma vacina que incluísse no mínimo 7 variantes da DBPII, o que tornaria inviável o desenvolvimento desta vacina (Sousa *et al.*, 2010).

A resposta imune contra DBPII é, então, complexa, pois predomina anticorpos do tipo cepa-específicos, com poucos indivíduos desenvolvendo anticorpos neutralizantes de amplo espectro. Apesar disto, os nossos achados e de outros grupos confirmam que alguns indivíduos são capazes de desenvolver uma resposta de BIAbs de longa duração e que

independe da cepa do parasito (King *et al.*, 2008; Souza-Silva *et al.*, 2010; Cole-Tobian *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2016). Estes indivíduos, denominados “respondedores de elite”, reforçam o potencial desta proteína como candidata a vacina contra o *P. vivax*.

1.5.3- Família DEKnull

Visando ultrapassar o alto polimorfismo da DBPII, antígenos sintéticos dessa proteína têm sido produzidos sem as regiões polimórficas (Chen *et al.*, 2015). A racional tem sido a de que epítomos conservados e não-imunodominantes da DBPII são responsáveis pela resposta imune protetora dos chamados “respondedores de elite” (Ntumngia *et al.*, 2012). Para tal, fez-se necessário identificar inicialmente o epítomo imunodominante mais polimórfico da região II da DBP, intitulado DEK (384D, 385E, 386K, 388Q, 389Q, 390R, 392K e 393Q). De fato, os estudos demonstram que a maior parte da resposta imune naturalmente adquirida contra a DBPII é dirigida para esse epítomo (Chootong *et al.*, 2010). Por essa razão, nosso grupo de pesquisa – em colaboração com pesquisadores da USF (Dr. JH Adams) em Tampa (USA) – tem buscado a construção de antígenos sintéticos baseados na DBPII (sem a região DEK) como base de uma vacina que busque induzir proteção imune neutralizante.

A proteína recombinante, DEKnull, construída a partir de mutações site-específicas (Figura 5A), quando utilizada para imunizar camundongos se mostrou capaz de produzir BIABs de ampla reatividade (Ntumngia *et al.*, 2012). Entretanto, quando testada na Amazônia brasileira apresentou baixa imunogenicidade (Lima, Dissertação de Mestrado, 2017). Os resultados pouco promissores em populações humanas levaram à necessidade de aprimoramento da construção original da DEKnull.

Na chamada segunda geração de DEKnull, denominada DEKnull-2 (Figura 5B), foram mutados, além do epítomo DEK, vários outros resíduos polimórficos (Ntumngia *et al.*, 2012). Os resultados iniciais em camundongos experimentalmente imunizados com a DEKnull-2 confirmaram elevada imunogenicidade desta proteína e indução de anticorpos inibitórios de ampla reatividade, isto é, contra diferentes cepas do parasito (Ntumngia *et al.*, 2012).

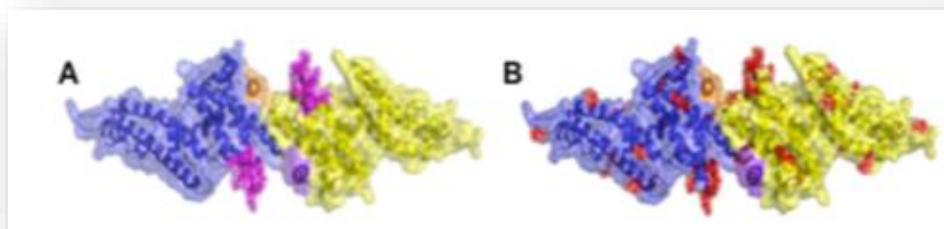


Figura 5. **Proteínas recombinantes baseadas em regiões conservadas da DBP região II.** A DBPII do *P. vivax* se liga à DARC através da formação de dímeros, logo os monômeros de DEKnull (A) e DEKnull-2 (B) estão representados em azul e amarelo formando um dímero. Na DEKnull foi mutada apenas a região DEK de cada monômero (roxo) e na DEKnull-2, além da região DEK foram também modificados diversos outros resíduos polimórficos (vermelho). **Fonte:** Adaptado de Ntumngia *et al.*, 2017.

Em populações da Amazônia brasileira, foi possível demonstrar que indivíduos com história de longa exposição à malária apresentaram altos níveis de IgGs naturalmente adquiridos contra a DEKnull-2, sendo a resposta de longa duração, pois se manteve estável por, no mínimo, seis anos de acompanhamento, mesmo na ausência da infecção ou da doença clínica (Ntumngia *et al.*, 2017). Além disto, parte desta resposta incluía os anticorpos inibitórios de ampla reatividade (BIAbs). Observou-se ainda que os respondedores de elite tinham altos títulos de anticorpos contra a DEKnull-2, confirmando seu potencial como vacina.

Em resumo, a proteína recombinante DEKnull-2, se mostrou um excelente protótipo vacinal contra o *P. vivax* pois foi altamente imunogênica e induziu a produção de anticorpos neutralizantes contra diferentes variantes alélicas da DBPII. Esses resultados bem-sucedidos indicam que direcionar a resposta imune para epítomos funcionais conservados faz-se necessário para induzir uma imunidade que transcenda a especificidade de cepa, constituindo uma abordagem promissora para o desenvolvimento de vacinas contra a malária vivax. Esses recentes e animadores resultados têm impulsionado no nosso grupo na investigação da DEKnull-2 como principal candidato vacinal para a malária causada pelo *P. vivax*.

2-Justificativa

O combate à malária é histórico, todavia são muitas as dificuldades para o controle da doença, principalmente daquela causada pelo *Plasmodium vivax*. O *P. vivax* possui algumas particularidades biológicas que o diferenciam do *Plasmodium falciparum*, espécie mais patogênica e que predomina no continente africano. De relevância, o *P. vivax* se caracteriza pela presença de recaídas, produção precoce de gametócitos e parasitemias abaixo do limite de detecção do diagnóstico de rotina, o que torna essa espécie um grande desafio para os programas de controle (revisto por Armistead & Adams, 2018). Como consequência, as medidas atuais de controle são mais eficientes contra o *P. falciparum* que contra o *P. vivax* (revisto por Griffing *et al.*, 2015). Outro agravante é que nos últimos anos casos graves de malária por *P. vivax* têm sido reportados ao redor do mundo (Tjitra *et al.*, 2008; revisto por Anstey *et al.*, 2012), inclusive no Brasil (Alexandre *et al.*, 2010; Lacerda *et al.*, 2012). Na Amazônia brasileira, o número de casos de malária por *P. vivax* tem crescido nos últimos anos, onde esta espécie é responsável por cerca de 80% dos casos (Camargo *et al.*, 1999; Ladeia-Andrade *et al.*, 2009; WHO 2019).

O desenvolvimento de uma vacina eficaz para auxiliar no controle da malária por *P. vivax* ainda está distante de ser obtido, principalmente devido à escassez de conhecimentos básicos sobre o parasito. Apesar disto, resultados promissores têm sido obtidos, particularmente no que se refere aos antígenos candidatos a compor uma vacina contra as formas sanguíneas do *P. vivax* (revisto por López *et al.*, 2017). Neste sentido, os estudos que busquem identificar mecanismos imunológicos desencadeados pelo hospedeiro frente à infecção devem ser priorizados, já que esses são fundamentais para o desenvolvimento de vacinas que induzam uma proteção de longa duração.

Sabendo-se que a principal via de invasão dos reticulócitos pelo *P. vivax* é através da interação DBPII-DARC (Miller *et al.*, 1976; Adams *et al.*, 1992), diferentes estudos têm sugerido a viabilidade do desenvolvimento de uma vacina capaz de bloquear tal interação e, consequentemente, a progressão da infecção (revisto por Ntumngia *et al.*, 2012). De fato, anticorpos IgGs capazes de bloquear a ligação DBPII-DARC e a invasão ao reticulócito já foram descritos em indivíduos naturalmente expostos ao *P. vivax* (Grimberg *et al.*, 2007; Ceravolo *et al.*, 2008; King *et al.*, 2008; Souza-Silva *et al.*, 2014) o que reforça o potencial da DBPII como antígeno candidato a vacina.

Entretanto a DBPII é altamente polimórfica (Tsuboi *et al.*, 1994; Cole-Tobian & King, 2003) e por isso a resposta imune desenvolvida contra a proteína é predominantemente do tipo cepa-específica (Ceravolo *et al.*, 2009; Cole-Tobian *et al.*, 2009; Chootong *et al.*, 2012). Com o objetivo de desenvolver uma vacina que induza uma imunidade que transcenda a cepa do parasito, nosso grupo de pesquisa, em colaboração com o Dr. JH Adams (USF, Tampa, USA), desenvolveu um protótipo vacinal baseado na DBPII - denominado DEKnull-2 - que se mostrou imunogênico em animais experimentais e reconhecido por indivíduos naturalmente expostos à malária na Amazônia (Ntumngia *et al.*, 2017). Apesar da resposta imune contra a DEKnull-2 parecer

ser de ampla reatividade e longa duração faz-se necessário aprofundar os estudos de resposta humoral, particularmente na relação entre os anticorpos IgM anti-DBPII, cuja resposta nunca foi investigada.

Embora o papel protetor de anticorpos IgG anti-DBPII esteja bem demonstrado na malária por *P. vivax* (King *et al.*, 2008; Nicolette *et al.*, 2016), a contribuição dos anticorpos IgM em tal resposta é ainda desconhecida. Isto é bastante relevante já que o papel dos anticorpos IgM na malária tem sido reavaliado nos últimos anos. Em modelo murino foi possível demonstrar a produção de anticorpos IgM protetores durante a malária experimental, o que fornece evidências de um mecanismo adicional pelo qual o sistema imune controla a infecção por *Plasmodium* (Couper *et al.*, 2005; Borges Da Silva *et al.*, 2018). Esses resultados podem explicar dados recentes que associaram a intensidade e a amplitude dos anticorpos IgM específicos para o *P. falciparum* com a resistência à infecção por malária (Arama *et al.*, 2015). Além disto, um novo modelo de cinética destes anticorpos tem sido proposto na malária, com anticorpos IgM participando intensamente da resposta secundária (Boyle *et al.*, 2019). Em conjunto, esses achados demonstram a importância de se investigar a resposta de IgM pelas estratégias vacinais. Isto é particularmente relevante já que conhecer o papel de anticorpos IgM DBPII-específicos pode levar ao aprimoramento da DEKnull-2 como vacina.

3- Objetivos

3.1- Objetivo geral

Estudar a resposta imune humoral de longa duração contra a *Duffy Binding Protein II* (DBPII) do *P. vivax* em uma população do Amazonas, área de transmissão instável.

3.1.1- Objetivos específicos

1- Caracterizar o perfil de resposta dos anticorpos IgM e IgG contra epítomos variáveis e conservados da DBPII, em uma comunidade de assentamento agrícola do Amazonas, durante períodos de alta e baixa transmissão de malária na região;

2- Analisar este perfil de resposta humoral em indivíduos com infecções agudas pelo *P. vivax*;

3- Comparar a dinâmica da resposta e avidéz dos anticorpos IgM e IgG em indivíduos com anticorpos IgG inibitórios da ligação DBPII-DARC (BIAbs) de longa duração.

4- Metodologia

4.1- Área e população de estudo

O presente estudo foi realizado na comunidade rural de Rio Pardo (1°46'S, 1°54'S, 60°22'O, 60°10'O), localizada no município de Presidente Figueiredo, estado do Amazonas, Brasil. A comunidade de Rio Pardo se localiza a 160 Km de Manaus, capital do Amazonas, com o principal acesso pela estrada pavimentada, BR-174, que conecta o Amazonas ao estado de Roraima (Figura 6A).

A população de Rio Pardo/AM é originária de um assentamento agrícola oficialmente criado em 1996 pelo INCRA, como parte de um grande projeto de colonização do Amazonas (De Castro *et al.*, 2006). O assentamento de Rio Pardo apresenta as vias organizadas de acordo com o desflorestamento típico observado ao longo da floresta Amazônica conhecido como “espinha de peixe” (Figura 6B) (revisto por Browder *et al.*, 2008). Esta organização consiste em uma via principal não pavimentada que atravessa Rio Pardo. Dessa via denominada de Principal saem vias laterais perpendiculares, todas não pavimentadas também e rodeadas pela floresta tropical. Tais vias são denominadas localmente de “Ramais” e, ao todo, somam sete: Samuel, Novo Paraíso, Gusmão, Terra Preta, Taxista, Novo Progresso e de Principal. No entanto, quase metade da população (48,6%) é ribeirinha e vive em habitações localizadas à 1,5 Km das margens dos igarapés, por isso essa região é conhecida como Igarapé (Figura 6C) (Kano *et al.*, 2012).

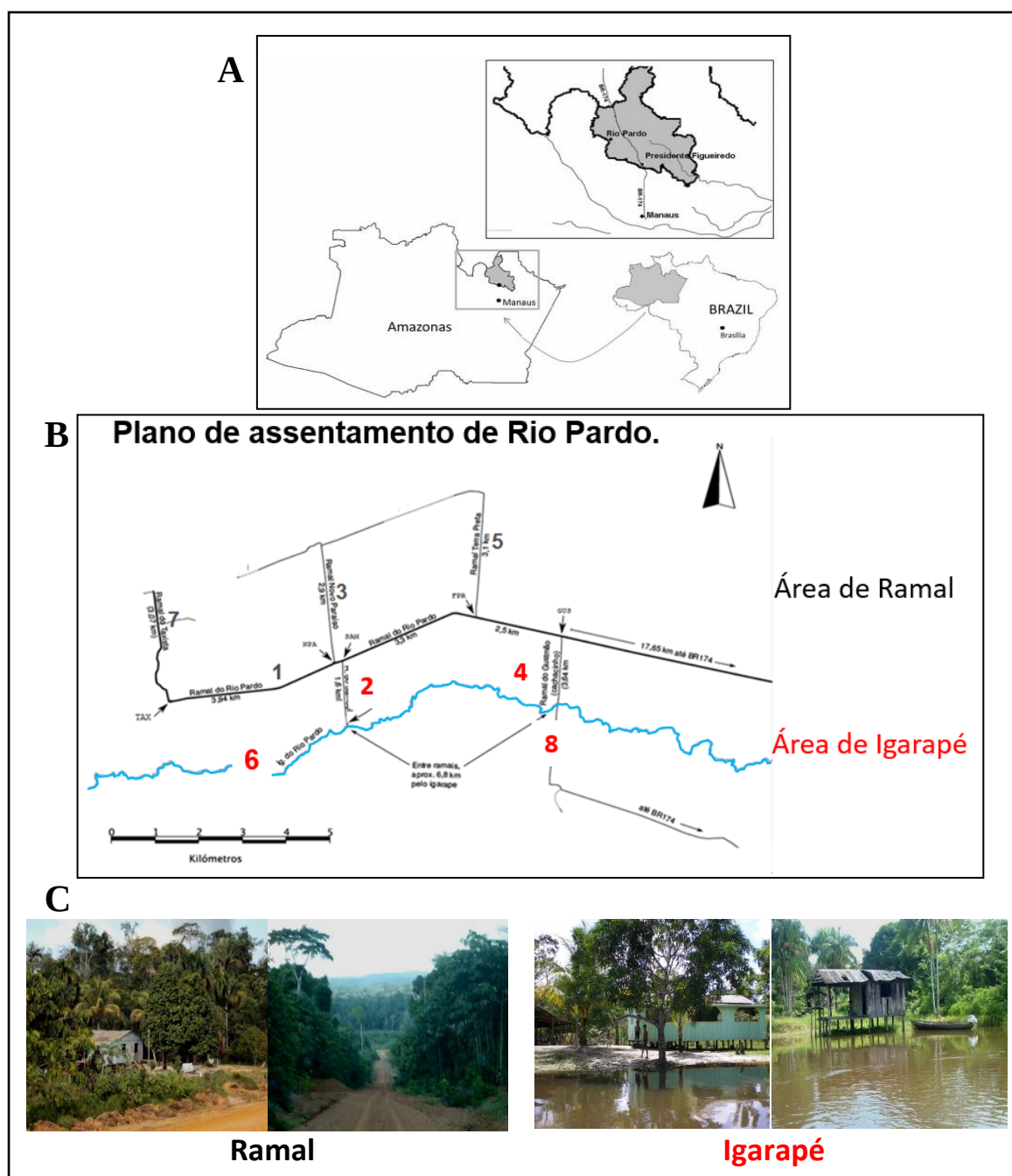


Figura 6. **Mapa ilustrando a área de estudo, comunidade de Rio Pardo, Estado do Amazonas, Brasil.** **A.** Rio Pardo se localiza no município de Presidente Figueiredo, à 160Km de Manaus, capital do Amazonas. **B.** O plano de assentamento agrícola que deu origem a comunidade de Rio Pardo é característico de “espinha de peixe” e consiste em uma via principal (1) de onde partem vias não pavimentadas (Ramais) em direção ao interior da floresta Amazônica (3, 5 e 7) e em direção aos igarapés (2, 4, 6 e 8). **C** Fotografia dos Ramais e dos Igarapés.

A economia da região gira em torno da agricultura de subsistência e da pesca nos igarapés. A população ribeirinha e os pescadores são mais expostos aos mosquitos vetores da malária e por isso tem mais risco de contrair a doença. Além disso, algumas habitações, principalmente aquelas localizadas às margens do igarapé, são consideradas inadequadas para evitar contato com os vetores (sem parede ou parede parcial), aumentando ainda mais o risco de exposição à transmissão da doença. O serviço de saúde em Rio Pardo é

precário contando somente com um posto de saúde, administrado pelo município, e que é responsável pelo diagnóstico de malária e por fornecer o tratamento gratuito para os moradores.

O clima na região é úmido, com temperatura média anual de 31°C e precipitação média anual de 2.000mm por ano. Existem duas estações bem definidas: um período chuvoso que compreende novembro a maio e um período mais seco de junho a outubro. A transmissão da malária em Rio Pardo ocorre durante o ano todo, mas a região é considerada hipoendêmica. O Índice Parasitológico Anual (IPA) tem variado ao longo dos anos demonstrando que a transmissão da malária é instável na região. Em 2008, ano de início do estudo, o IPA era de 127 casos por 1000 habitantes (SVS/MS, 2009). Na ocasião tanto o *P. vivax* quanto o *P. falciparum* co-circulavam na região, sendo o *P. vivax* responsável por aproximadamente 80% dos casos (SVS/MS, 2009).

4.2-Desenho do estudo com abordagem retrospectiva longitudinal

O estudo foi aprovado quanto aos aspectos éticos e metodológicos pelo comitê de ética do Centro de Pesquisas René Rachou (Report N° 007/2006, N° 07/2009, N° 12/2010 e N°26/2013 e CAAE 50522115.7.0000.5091).

Em novembro de 2008, nosso grupo de pesquisa iniciou um estudo longitudinal, do tipo coorte aberta, na comunidade de Rio Pardo, que foi descrito em detalhes em publicações anteriores (Kano *et al.*, 2012; Sousa-Silva *et al.*, 2014; Pires *et al.*, 2018). Para tal, toda a comunidade de Rio Pardo (cerca de 120 famílias) foi visitada pela equipe de pesquisa que explicou os objetivos do trabalho. Os indivíduos que aceitaram participar do estudo assinaram um consentimento livre e esclarecido. No caso dos menores, os guardiões legais concederam tal consentimento. Resumidamente, na linha de base do estudo foram realizados os seguintes procedimentos (Kano *et al.*, 2012): **(i)** aplicação de um questionário para obtenção de informações demográficas, epidemiológicas e clínicas; **(ii)** coleta de sangue venoso (maiores de 5 anos de idade); **(iii)** diagnóstico de malária patente por microscopia ótica; **(iv)** extração do DNA para o diagnóstico de malária subpatente através de PCR, realizado a posteriori no laboratório em Belo Horizonte e **(v)** coleta do plasma. Todos os indivíduos com infecções pelo *P. falciparum* ou mistas foram excluídos deste estudo e não houve casos de malária grave registrados na população.

Para o presente estudo, os critérios de elegibilidade incluíram **(i)** indivíduos adultos, de ambos os sexos, com amostras sucessivas correspondendo aos períodos de alta e baixa transmissão de malária; **(ii)** no caso de mulheres, auto-relato de ausência de gravidez; e **(iii)** sem comorbidade passível de rastreamento. Com base nesses critérios a população amostral totalizou 163 indivíduos que correspondem a uma amostra representativa da população adulta original (n = 300) em relação a idade, sexo e tempo de exposição à doença (Pires *et al.*, 2018). Além do primeiro corte transversal em 2008, onde foram incluídos 149 indivíduos, mais cinco cortes transversais foram realizados ao longo dos nove anos do estudo (Figura 7). Mais especificamente, dois cortes transversais foram realizados 6 e 12 meses após a linha de base do estudo (Figura 7) contando com 146 e 151 indivíduos respectivamente e os demais realizados 6 (agosto de 2014), 7 (julho

de 2015) e 9 anos após o início do estudo (julho de 2017) incluindo 91, 92 e 81 indivíduos respectivamente.

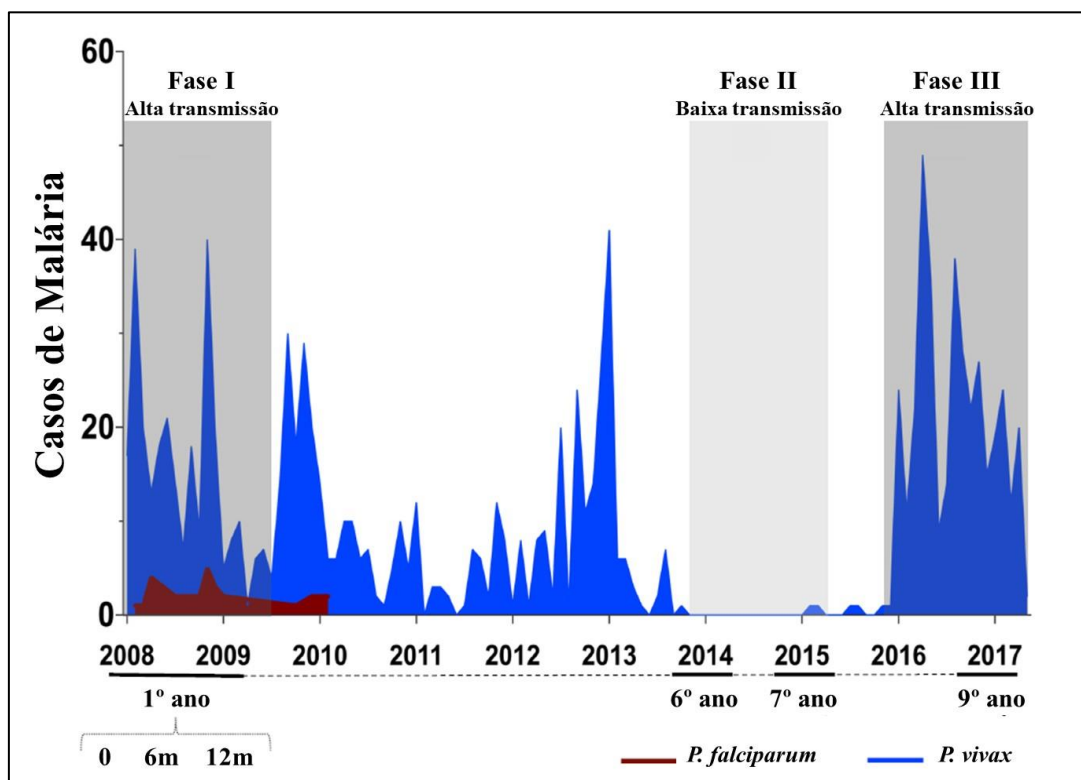


Figura 7. Casos de malária notificados no assentamento agrícola de Rio Pardo (Amazonas, Brasil) durante o período de estudo, 2008–2017. O desenho do estudo envolveu uma coorte prospectiva aberta, realizado em Rio Pardo, com seis cortes transversais realizados em períodos de alta (cinza escuro, I e III) e baixa transmissão de malária (cinza claro, II). Os três primeiros cortes foram realizados no primeiro ano do estudo (0, 6 e 12 meses) e os últimos três realizados 6, 7 e 9 anos após a linha de base (tempo zero). O número total de casos positivos para malária na região, avaliado por microscopia ótica, foi obtido pelo Sistema de Registro de Vigilância Nacional de Malária (SIVEP-Malária) com casos de *P. falciparum* (vermelho) e *P. vivax* (azul) plotados por mês. **Fonte:** Adaptado de Pires *et al.*, 2018.

O número de casos de malária flutuou ao longo dos nove anos. No primeiro ano do estudo, que compreendeu três cortes transversais (0, 6 e 12 meses), a transmissão de malária foi considerada alta e este período denominado de fase I (Figura 7). No sexto e sétimo ano do estudo o número de casos de malária diminuiu drasticamente e, portanto, esta fase foi denominada II. Finalmente, no 9º ano, a transmissão voltou a subir, o que resultou em um aumento do número de casos, sendo denominada fase III. Assim, foi possível analisar a dinâmica de resposta de anticorpos durante as diferentes fases de transmissão de malária (I - alta, II - baixa e III - alta).

4.3- Coleta e processamento das amostras de sangue

De cada indivíduo incluído no estudo foi coletado sangue venoso em tubos a vácuo contendo EDTA como anticoagulante (10mL). O sangue foi processado imediatamente após coleta, sendo cerca de 10 µl utilizado para o diagnóstico da malária patente por microscopia ótica, um mililitro utilizado para a extração de DNA e amplificação por ensaios de PCR (item 4.3.1) e, do restante foram obtidos plasmas por

centrifugação (350g por 10 minutos, em temperatura ambiente) congelados a -20°C até uso (itens 4.5, 4.6 e 4.7). Todo o material biológico foi estocado no biorrepositório do grupo de pesquisas em Biologia Molecular e Imunologia da Malária, tendo como guardiões Luzia H Carvalho e Flora S Kano, CAAE 50522115.7.0000.5091.

4.3.1. Diagnóstico de malária

O diagnóstico da malária patente foi realizado por microscopia ótica conforme preconizado pelo ministério da saúde (SVS, 2009). Resumidamente microscopistas experientes do posto de diagnóstico de Rio Pardo confeccionaram e examinaram as lâminas de gota espessa coradas com Giemsa e os resultados foram expressos, inicialmente, como positivo ou negativo. Em seguida os indivíduos positivos foram classificados pelo método semi-quantitativo de cruzeiros, além de prontamente tratados pela equipe local como recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil. Já o diagnóstico molecular da malária subpatente foi realizado por PCR em tempo real, de acordo com o protocolo padronizado pelo nosso grupo de pesquisa (Amaral *et al.*, 2019), em Belo Horizonte no nosso laboratório (Biologia Molecular e Imunologia da Malária, FIOCRUZ-Minas). Resumidamente o DNA foi extraído das amostras de sangue total através da utilização do kit comercial Gentra Puregene Blood core kit C (PUREGENE, Gentra System, Minneapolis, USA). Em seguida a sequência Pvr47 localizada em regiões subteloméricas do genoma *P. vivax* foi amplificada por sonda e iniciadores que se ligam especificamente a essas regiões. Os resultados foram expressos como positivo ou negativo.

4.4- Proteínas recombinantes de formas sanguíneas do *P. vivax*

Três proteínas de merozoíto do *P. vivax*, consideradas como alvos vacinais promissores foram produzidas *in vitro* com a finalidade de serem avaliadas quanto aos aspectos imunoepidemiológicos na população de Rio Pardo. Ênfase foi dada as proteínas relacionadas à DBPII, incluindo um novo protótipo vacinal (DEKnull-2).

4.4.1- Proteína de ligação ao grupo sanguíneo Duffy do *Plasmodium vivax* região II (PvDBPII)

Para a expressão e purificação da DBPII-Sal1, cepa de referência (Fang *et al.*, 1991), a sequência codificante dessa proteína (aminoácidos 243-573 Sal-1) foi clonada no plasmídeo pET21a+ (Novagen EMD Biosciences, Inc) específico para a expressão em *Escherichia coli*. A transformação foi realizada em *E. coli* BL21 (DE3) LysE (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) e as colônias positivas foram estocadas em glicerol a -80°C, conforme protocolo já padronizado pelo nosso grupo de pesquisa (Kano *et al.*, 2016; Pires *et al.*, 2018). Resumidamente, para a produção e purificação da proteína, as colônias positivas foram descongeladas e incubadas overnight. Em seguida a cultura foi diluída e mantida a 37°C sob agitação durante 2 horas. A indução ocorreu através da adição de IPTG (IsoPropyl-β-d-ThioGalactopyranoside). A DBPII foi purificada dos corpos de inclusão gerados pela indução, sob condições desnaturantes. Os corpos de inclusão foram lisados, recuperados por centrifugação, lavados e solubilizados.

A purificação da proteína recombinante se deu através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel Sefarose 6 (GE Healthcare, Pharmacia Biotech, São Paulo/SP, Brasil).

A pureza das frações eluídas foi conferida por meio de separação em gel SDS-PAGE e aquelas consideradas puras foram submetidas ao processo de re-enovelamento de acordo com o protocolo de (Singh *et al.*, 2003). Em seguida a proteína foi concentrada, filtrada em poros de 0.2µm de diâmetro, ajustada para a concentração final de 1mg/mL em PBS (Phosphate-Buffered Saline, 137mM de NaCl, 2,68mM de KCl, 10,1mM de Na₂HPO₄, 1,8mM de KH₂PO₄, pH 7,4) e por fim estocada a -80°C até a utilização. Foi realizado um teste de DTT (dithiothreitol) com a finalidade de avaliar a qualidade do re-enovelamento da proteína recombinante produzida.

4.4.2- DEKnull-2

A proteína recombinante DEKnull-2 foi construída a partir da sequência codificante da DBPII-Sal1, pelo grupo do nosso colaborador, Dr. John H. Adams (University of South Florida, Tampa, EUA) (Ntumngia *et al.*, 2012; Ntumngia *et al.*, 2017). Resumidamente, a sequência codificante para a PvDBPII-Sal1 foi modificada em diversos resíduos polimórficos (Vanbuskirk *et al.*, 2004), inclusive na região considerada mais polimórfica, a DEK, a fim de induzir uma resposta de anticorpos concentrada em regiões conservadas da proteína. Os aminoácidos substituídos foram os seguintes: R308, R319, L333, Y369, K371 D384, E385, K386, Q398, K392, N417, L424, W437, S447, Q454, T467, K492, I503, V505, V511, G515, resultando na DEKnull-2 (Ntumngia *et al.*, 2017).

A DEKnull-2 recombinante foi expressa em *E. coli*, purificada dos corpos de inclusão, submetida ao re-enovelamento e estocada na concentração de 1mg/mL pelo mesmo protocolo descrito para a DBPII Sal-1 (item 4.4.1). A conformação nativa da proteína recombinante foi confirmada por meio da utilização de anticorpos monoclonais anti-DBPII dependentes de conformação. A DEKnull-2 foi também submetida a ensaios de funcionalidade, confirmando a correta interação entre DBPII-DARC (Ntumngia *et al.*, 2017).

4.4.3- Proteína de superfície de merozoíto 1 (MSP-1₁₉) do *P. vivax*

A região C-terminal de 19kDa da proteína de superfície de merozoíto 1 (MSP-1₁₉) que compreende os aminoácidos 1616-1704 da MSP-1 (cepa Belém) do *P. vivax* foi gentilmente cedida pela Dra. Irene Soares (Instituto de Ciências Biológicas, ICB, Universidade de São Paulo, Brasil). Essa proteína contém uma cauda de histidina 6x fundida à parte carboxi-terminal (6xHis-tag) para auxiliar na purificação da mesma e os detalhes da sua construção foram descritos anteriormente (Soares *et al.*, 1999; Cunha *et al.*, 2001).

4.5- Detecção de anticorpos IgG e IgM contra proteínas recombinantes do *P. vivax* através do ensaio imunoenzimático convencional (ELISA)

A fim de avaliar o perfil da resposta de anticorpos IgG e IgM contra os antígenos do *P. vivax* utilizados como protótipos vacinais, na população de Rio Pardo/AM, foi

utilizado o ensaio imun absorção enzimático indireto (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA indirect). Este ensaio imunoenzimático convencional para a detecção de anticorpos contra a DBPII-Sal1, a DEKnull-2 e a MSP-1₁₉ foi realizado como descrito anteriormente (Kano *et al.*, 2016; Pires *et al.*, 2018). Além disso, a concentração ótima dos antígenos, a diluição dos soros e dos anticorpos secundários foi determinada empiricamente por titulação prévia.

Resumidamente, placas de 96 poços (Maxysorp, Nunc, Dinamarca) foram sensibilizadas com as proteínas recombinantes nas seguintes concentrações: 3µg/mL de DBPII-Sal1, 3µg/mL de DEKnull-2 e 1µg/mL de MSP-1₁₉, todas diluídas em tampão de PBS 1X e incubadas por 16h a 4°C. Em seguida as placas foram lavadas com PBS Tween (0.05% de Tween 20 em PBS 1X) e incubadas por 1h com a solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em PBS Tween). Posteriormente as placas foram lavadas com PBS Tween e incubadas por 1h em estufa a 37°C com as amostras de plasma dos indivíduos de Rio Pardo em duplicata. Utilizou-se a diluição do plasma de 1:400 para detecção de anticorpos IgM e de 1:100 para detecção de anticorpos IgG, ambos em solução de PBS tween com 3% de leite desnatado.

Após o término da incubação com as amostras, as placas foram lavadas exaustivamente com PBS Tween e incubadas por 1h em estufa a 37°C com os anticorpos secundários anti-IgG (diluição 1:5000) ou anti-IgM (diluição 1:1250) humano conjugados à peroxidase (Sigma-Aldrich). Ambos anticorpos secundários foram diluídos também em solução de PBS tween contendo 3% de leite desnatado. Após um novo processo de lavagem das placas com PBS tween, a presença dos anticorpos IgM e IgG específicos foi detectada utilizando o substrato Dicloridrato de o-fenilenodiamina (o-phenylenediamine dihydrochloride – OPD) (Sigma-Aldrich) diluído em tampão 0,1M citrato de sódio pH 5,0 com 30% de peróxido de hidrogênio (Merck Millipore, São Paulo, Brasil). Após 30 min de incubação a reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico 4N. Finalmente a densidade ótica foi quantificada em leitor de ELISA com filtro de 492nm (Spectra Max 340PC 384, Molecular Devices).

Os resultados do ELISA foram expressos como Índice de Reatividade (IR), calculado como a razão entre a média da Densidade Ótica (DO) da duplicata de cada amostra e o *cut off*. Foi determinado um *cut off* para cada proteína que representa a média da DO de 20 indivíduos voluntários nunca expostos à malária somada a dois desvios padrões. Os valores de IR maiores ou iguais a 1.0 foram considerados positivos.

4.6- Avaliação da avidéz dos anticorpos IgM e IgG contra as proteínas recombinantes do *P. vivax*

Com a finalidade de caracterizar melhor a resposta dos anticorpos IgM e IgG contra as proteínas recombinantes do *P. vivax* nessa população, foi realizado um ensaio de avidéz que avalia a força de ligação dos anticorpos com os antígenos. Para este ensaio foi selecionada uma amostra representativa da população estudada cujo perfil de anticorpos IgG e IgM será aqui caracterizado (item 4.5).

O ensaio de avidéz se baseou no ELISA convencional, porém, com a adição de uma nova etapa envolvendo um agente caotrópico (ureia) como dissociador do complexo antígeno-anticorpo (revisto por Bennion & Daggett, 2003). Para tal, duas placas foram sensibilizadas com o mesmo antígeno (placas espelho) e a detecção de anticorpos IgM ou IgG foi realizada conforme descrito no item 4.5 com pequenas modificações. Especificamente, após a incubação das placas com o plasma dos indivíduos e lavagem com PBS Tween, uma das placas foi incubada com solução de ureia (5M) e a outra espelho com PBS, sendo ambas as placas incubadas por 30 min a temperatura ambiente. Os ensaios preliminares permitiram escolher a concentração de 5M de ureia como a concentração ideal para avaliar a avidéz da resposta de anticorpos. Após a incubação com ureia ou PBS, as placas foram lavadas novamente com PBS Tween, incubadas com o anticorpo secundário IgM ou IgG e o protocolo seguiu conforme descrito anteriormente.

O resultado foi expresso como percentagem de avidéz que representou a razão entre a média da DO da duplicata da amostra com agente caotrópico e a média da DO da duplicata da amostra sem o agente caotrópico $\times 100$. Assim, as porcentagens obtidas corresponderam a quantidade de anticorpos que permaneceram ligados ao antígeno após a adição da solução de ureia. Valores abaixo de 30% foram considerados como baixa avidéz, valores entre 30-50% como avidéz intermediária e acima de 50% alta avidéz conforme proposto anteriormente (Zakeri *et al.*, 2011).

4.7- Ensaio funcional para detecção de anticorpos inibitórios (BIAbs) contra a proteína DBPII do *P. vivax*

Para verificar se os indivíduos estudados apresentavam anticorpos capazes de inibir a interação entre a proteína DBPII do *P. vivax* e o receptor DARC presente eritrócitos foi realizado um ensaio funcional de citoaderência eritrocítica *in vitro*.

Foram utilizadas células COS-7, originalmente isoladas a partir de células de rim de primata africano, e modificada pelo vírus SV 40 (American Type Culture Collection - ATCC, Manassas, VA), pois esta linhagem de células de mamíferos é permissível a transfecção. Neste processo as células COS-7 recebem um plasmídeo contendo a sequência da proteína DBPII-Sal1 e passam, então, a expressar essa proteína na superfície externa da membrana plasmática. O plasmídeo pEGFP-DBPII foi construído previamente pelo nosso grupo de pesquisa (Souza-Silva *et al.*, 2010) e as células foram mantidas em meio de cultura na estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂, conforme protocolo padrão (Phelan, 2003). No momento da transfecção $1,5 \times 10^5$ células foram adicionadas em cada poço da placa de cultura (Nunc) e incubadas com 0,5ug/poço de DNA plasmidial e complexo de lipossomos (5% de reagente Plus e 3% de lipofectamina) (Invitrogen Life Technologies). A eficiência da transfecção foi verificada por meio de um microscópio invertido de fluorescência (Nikon TE2000E, Melville, NY, USA) e como mais de 80% das células apresentaram a proteína DBPII-Sal1 marcada com fluorescência verde a eficiência foi confirmada.

Quarenta e oito horas após a transfecção as células COS-7 aderidas, expressando a DBPII-Sal1, foram incubadas por 1h em estufa com as amostras de plasma-teste

diluídos (1:40) em meio DMEM incompleto. Em seguida eritrócitos humanos O⁺/DARC positivos (em solução de 10% em meio DMEM completo) foram adicionados aos poços das placas contendo COS-7, plasma e as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2h. Ao final deste tempo lavou-se as placas três vezes com PBS 1X para que os eritrócitos não aderidos fossem removidos.

Como a DBPII do *P. vivax* se liga à DARC, ao incubar a COS-7 DBPII⁺ com eritrócitos DARC⁺ é observado um grande número de rosetas no campo ótico (100% de ligação). No entanto, com a adição do plasma dos indivíduos expostos ao *P. vivax*, os anticorpos específicos contra a DBPII-Sal1 podem inibir a interação entre DBPII-DARC e, ao adicionar os eritrócitos DARC⁺ não é possível visualizar a formação de rosetas positivas. Por isso, para a interpretação do resultado é necessário a contagem de rosetas positivas (COS-7 com mais de 50% da superfície coberta por eritrócitos aderentes) em 20 campos óticos sob aumento de x200. Para o controle negativo foi utilizado um pool de 10 amostras de plasma de indivíduos de Rio Pardo não respondedores no ELISA convencional e que não inibiram a ligação da COS-7 ao eritrócito (100% de ligação). O controle positivo incluiu um pool de plasmas de indivíduos com histórico de longa exposição à malária na região Amazônica e que inibiram a ligação (0% de ligação). O resultado, expresso como % Inibição, foi calculado como $(R_c - R_t)/R_c \times 100$ onde R_c é a média do número de rosetas no controle negativo e R_t é a média do número de rosetas nos poços com o plasma dos indivíduos de Rio Pardo. Amostras de plasma que inibiram mais de 50% da ligação DBPII-DARC foram consideradas positivas no ensaio funcional (Ceravolo *et al.*, 2008).

4.8-Análises Estatísticas

Através do programa Epidata (<http://www.epidata.dk>) foi construído um Banco de Dados contendo todas as informações obtidas referentes a população estudada e os resultados obtidos durante o estudo longitudinal.

Para a análise estatística dos dados obtidos através do ensaio sorológico de ELISA, a resposta de anticorpos foi avaliada tanto como variável contínua (índice de Reatividade - IR) como variável binária categórica (frequência de resposta). Ambas as análises foram necessárias dado que a soropositividade pode saturar dependendo do antígeno estudado e da população alvo (Yman *et al.*, 2016). O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliar a normalidade das variáveis. As diferenças na soropositividade foram avaliadas através do teste estatístico de Qui-quadrado com correção de Yates. As diferenças entre as medianas dos IRs foram testadas através de Mann-Whitney U com o teste “post hoc” de Dunn. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para verificar a presença de correlação entre variáveis contínuas, como foi o caso da resposta de anticorpos IgG versus IgM na população de estudo. Todos os gráficos e análises foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism, versão 7 (GraphPad Software, La Jolla Califórnia USA, www.graphpad.com).

As medianas dos valores de avidéz dos anticorpos IgM e IgG frente aos antígenos baseados na DBPII foram comparadas através do teste estatístico de Mann-Whitney U

com o teste “post hoc” de Dunn e também ao longo dos nove anos pelo teste de análise de variância (ANOVA).

5- Resultados

Parte dos resultados aqui apresentados foram publicados no artigo intitulado “*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 One15(5):e0232786, 2020 (Anexo I).

5.1- Características dos indivíduos estudados e resposta de anticorpos antígeno-específica na linha de base do estudo

Os 163 indivíduos incluídos no estudo eram adultos (mediana de idade 42 anos), com proporção semelhante entre homens e mulheres (Tabela 1). Como a população de estudo é predominantemente nativa da região Amazônica, a idade dos indivíduos estudados se correlacionou com o tempo de exposição à malária, que foi em média 35 anos (Correlação de Spearman, $r^2 = 0.746$, $p = 0.000$).

Na amostra estudada, a proporção de ribeirinhos *versus* não ribeirinhos foi de 1:1 (Tabela 1). No momento do recrutamento, 22 (13%) dos indivíduos estudados eram positivos para *P. vivax*, sendo 5 (3%) diagnosticados com malária aguda pela microscopia ótica (infecções patentes), e 17 (10%) como portadores de infecções subpatentes (positivos apenas pelos ensaios de PCR).

Considerando que a DBPII é altamente polimórfica e tende a induzir uma resposta humoral do tipo cepa específica, foram utilizadas no presente estudo duas variantes recombinantes da DBPII, sendo a primeira Sal-1, cepa de referência e frequente na área de estudo, e a segunda a DEKnull-2, cuja resposta de anticorpos é direcionada para os epítomos conservados da DBPII. Na Tabela 1 foi possível observar que enquanto 39% dos indivíduos apresentaram anticorpos IgM para os epítomos variantes da DBPII (DBPII-Sal1), apenas 23% tinham anticorpos IgM dirigidos para os epítomos conservados (DEKnull-2) ($X^2 = 9.698$; $p = 0.018$). Já em relação aos anticorpos IgG, uma proporção similar de indivíduos (46 - 43%) respondeu para as duas proteínas testadas ($p > 0.05$).

Tabela 1. Características demográficas, epidemiológicas e imunológicas dos 163 indivíduos estudados no momento do recrutamento (linha-de-base).

Características		
Mediana de idade, anos (IQR)		42 (28-53)
Sexo masculino : feminino		1.1:1
Auto-relato de episódios prévios de malária, mediana (IQR)		5 (3-15)
Tempo de residência na região Amazônica, em anos, mediana (IQR)		35 (24-50)
Local de residência na área de estudo, ribeirão: não-ribeirão		1:1
Infecção por <i>P. vivax</i> :		
Patente ¹ , n (%)		5 (3)
Sub patente ² , n (%)		17 (10)
Total, n (%)		22 (13)
Resposta de anticorpos ³ , positivo n (%):		
IgM*	DBPII-Sal1	64 (39)
	DEKnull-2	37 (23)
IgG	DBPII-Sal1	75 (46)
	DEKnull-2	69 (43)

IQR = Intervalo Interquartil

¹Infecções por *P. vivax* detectadas pela gota espessa na microscopia ótica convencional.

²Infecções por *P. vivax* detectadas por PCR em tempo real.

³Avaliado pela sorologia convencional (ELISA) utilizando proteínas recombinantes baseadas na *P. vivax* Duffy binding protein region II (DBPII-Sal1 ou DEKnull2)

*Diferença significativa entre DBPII—Sal1 e DEKnull2 (Teste de Qui-quadrado com correção de Yates, $X^2 = 9.698$; $p = 0.018$)

5.2- Dinâmica da resposta de anticorpos contra epítomos variantes e conservados da DBPII durante períodos de alta e baixa transmissão de malária na área de estudo

A resposta dos anticorpos IgM e IgG contra os epítomos variantes e conservados da DBPII foi avaliada, pela sorologia convencional (ELISA), nos indivíduos de Rio Pardo com história de longa exposição a níveis variáveis de transmissão de malária, como descrito nos métodos (Figura 7).

5.2.1- Resposta de anticorpos IgM contra as proteínas da DBPII

A Figura 8 ilustra a dinâmica temporal da resposta de anticorpos IgM, contra epítomos variantes e conservados da DBPII, na população de estudo. Considerando a linha de base do estudo, houve um predomínio de anticorpos IgM direcionados contra os epítomos variantes da DBPII-Sal1 em relação àqueles epítomos conservados presentes na DEKnull-2. Esta diferença de resposta ocorreu tanto com relação a frequência de

respondedores (40% vs 24% para DBPII-Sal1 vs DEKnull-2) quanto na intensidade da resposta (Tabela 2). O mesmo perfil de resposta foi observado ao longo do estudo (i.e., DBPII-Sal1 > DEKnull-2) independente dos níveis de transmissão de malária na região (Tabela 2). Após 9 anos de acompanhamento, 24% e 15% dos indivíduos estudados permaneceram respondedores a DBPII-Sal1 e DEKnull-2, respectivamente (Figura 8).

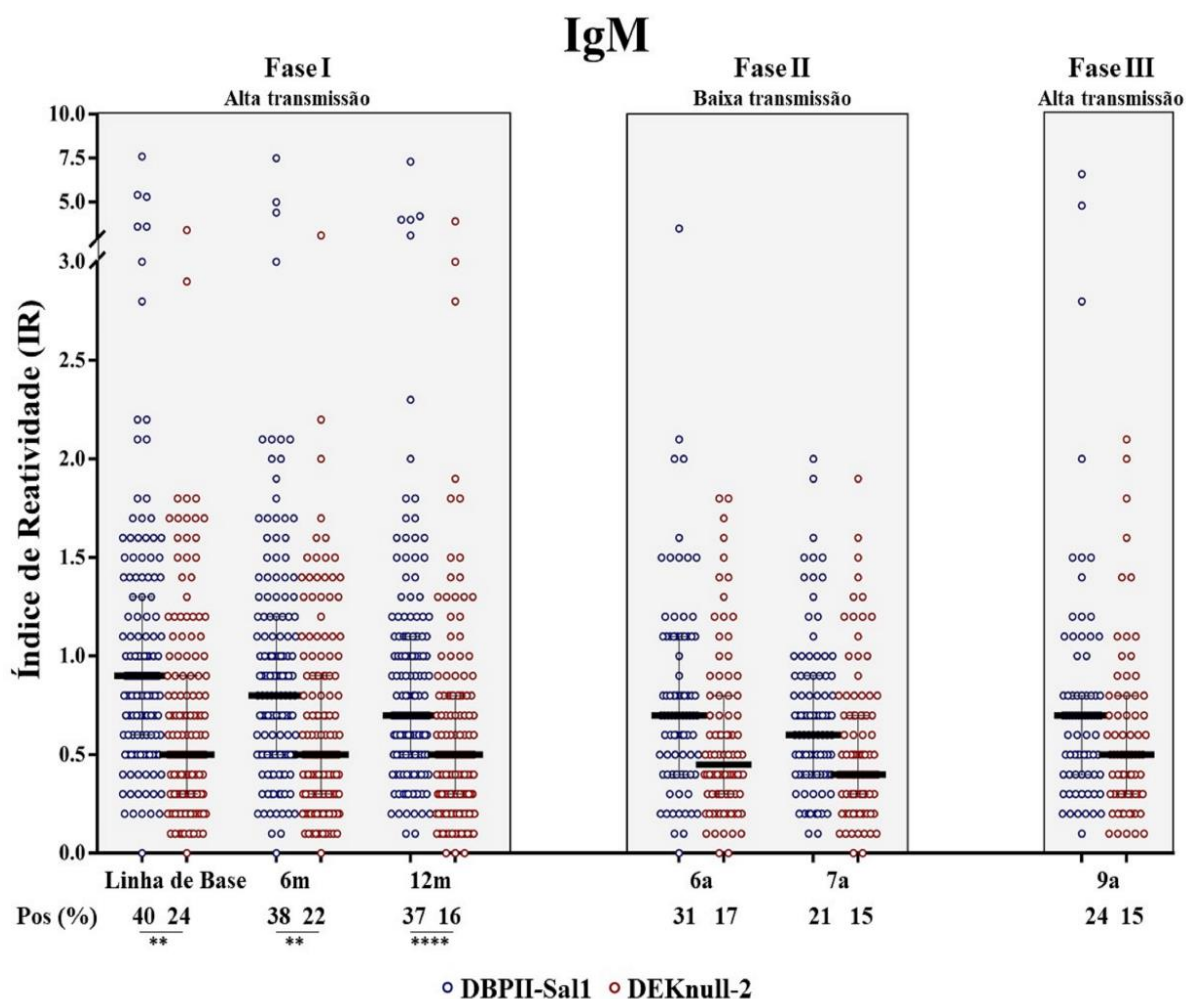


Figura 8. Níveis de anticorpos IgM epítomos variantes (DBPII-Sal1) ou conservados (DEKnull-2) avaliados na população de estudo, durante as fases de alta (I e III) e baixa (II) transmissão de malária. Os resultados foram expressos como Índice de Reatividade (IR) obtidos através do ensaio de ELISA, sendo os valores individuais representados em círculos abertos na cor azul e vermelha, respectivamente, para DBPII-Sal1 e DEKnull-2. As medianas (linha transversal) e intervalos interquartis (linha longitudinal) foram representados em preto. O estudo envolveu cortes transversais realizados durante períodos de alta (fases I e III) e baixa (fase II) transmissão de malária, conforme descrito na legenda da Figura 7 (Material e métodos). O IR foi calculado a partir da razão entre a média das Densidades Óticas (DO) obtidas para cada amostra teste pela média da DO das amostras dos controles negativos (n=20)-acrescida de dois desvio padrão, considerando como positivo IR>1. A frequência de soropositivos Pos (%) está representada abaixo do gráfico sendo que os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre as frequências de soropositivos para as duas proteínas em cada corte separadamente (teste de X²).

Tabela 2. Níveis de anticorpos IgM contra as proteínas baseadas na DBPII do *P. vivax* ao longo do estudo de coorte

		Fase I Alta transmissão			Fase II Baixa transmissão		Fase III Alta transmissão
		Linha de base Mediana (IQR) ¹	6 meses Mediana (IQR) ¹	12 meses Mediana (IQR) ¹	6 anos Mediana (IQR) ¹	7 anos Mediana (IQR) ¹	9 anos Mediana (IQR) ¹
		vs	vs	vs	vs	vs	vs
IgM	DBPII-Sal1	0.9 (0.6-1.3)	0.8 (0.5-1.2)	0.7 (0.5-1.1)	0.7 (0.4-1.1)	0.6 (0.4-0.9)	0.7 (0.4-0.8)
	DEKnull-2	0.5 (0.3-0.9)	0.5 (0.3-0.9)	0.5 (0.3-0.8)	0.5 (0.3-0.8)	0.4 (0.3-0.7)	0.5 (0.3-0.8)
	Valor de p²	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0008	0.0013	0.0154

¹A mediana e o Intervalo Interquartil (IQR) dos Índices de Reatividade (IR) foram determinados pelo ensaio de ELISA convencional realizado com o plasma dos indivíduos expostos ao *P. vivax*. O ELISA foi realizado com proteínas recombinantes baseadas na DBPII do *P. vivax* e o IR foi definido como a razão entre a média da densidade ótica (DO) da amostra de plasma e a média da DO do *cut-off*. O *cut-off* foi calculado a partir da média da DO de 20 indivíduos voluntários não-expostos ao *P. vivax* acrescido de dois desvios padrões.

²O valor de p foi obtido pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

5.2.2- Resposta de anticorpos IgG contra as proteínas da DBPII

Na população estudada, o perfil da resposta de anticorpos IgG dirigidos contra epítomos variantes ou conservados da DBPII foi diferente daquele observado para os anticorpos IgM. Durante todo o primeiro ano do estudo, fase I, a frequência de respondedores contra ambas as proteínas foi similar, variando de 44 a 48% (Figura 9). Além disso, não foi observada diferença na intensidade de resposta entre as proteínas estudadas (IR variando de 0,7 - 0,8; Tabela 3).

No entanto, durante a fase II, de baixa transmissão de malária, os níveis de anticorpos IgG variante-específicos reduziram significativamente (IR = 0,7 linha de base vs. IR = 0,2 - 0,0 para 6º e 7º ano, Tabela 3). Por outro lado, anticorpos IgG dirigidos aos epítomos conservados da DEKnull-2 continuaram relativamente estáveis (Tabela 3). O mesmo perfil de resposta foi observado em relação a frequência de respondedores. Mais especificamente, 48% responderam a DBPII-Sal1 na linha de base e apenas 18% no 7º ano do estudo (Figura 9). Em contrapartida a frequência de resposta a DEKnull-2 foi estável, variando de 45 e 49% (Figura 9). Este perfil de resposta se manteve até o fim do estudo.

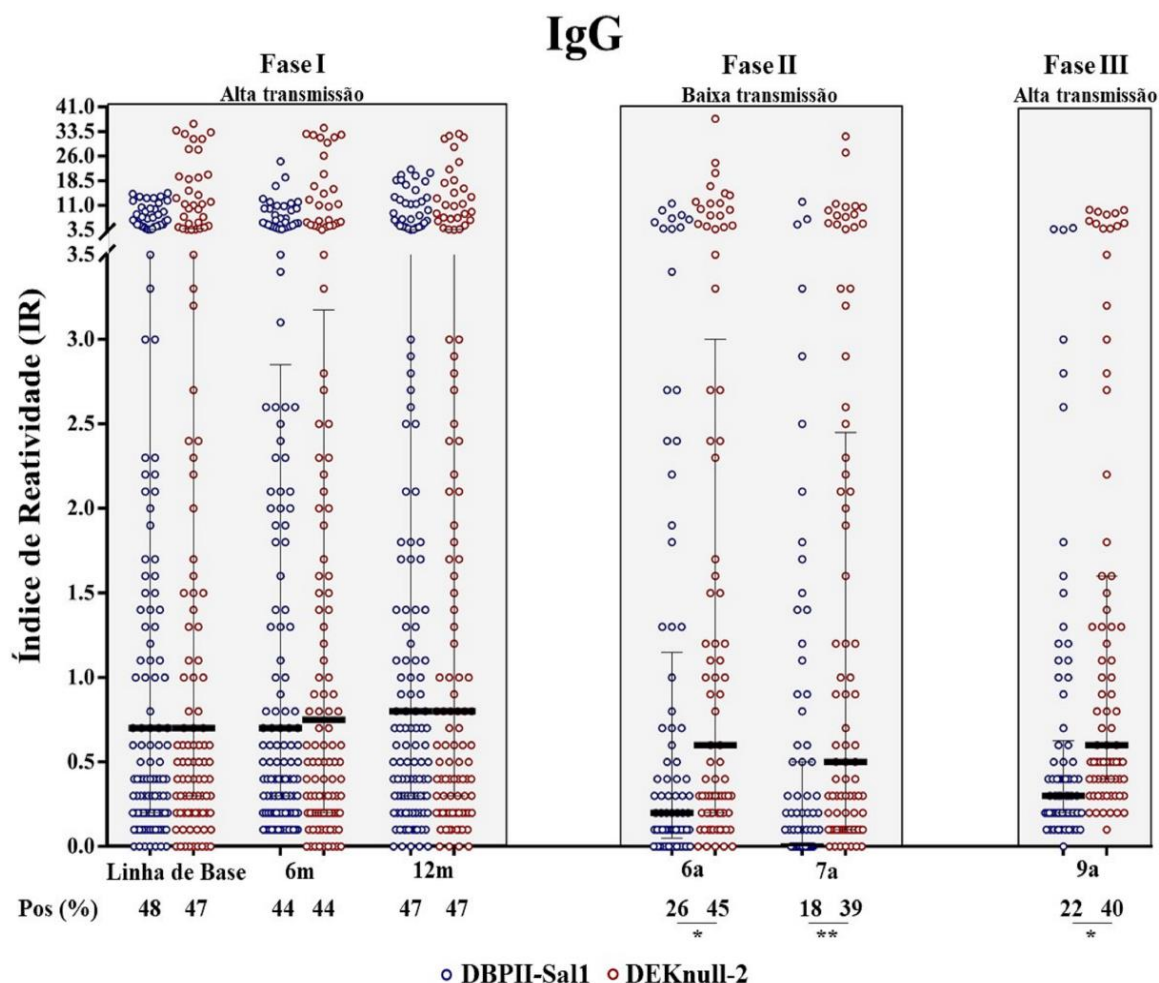


Figura 9. Níveis de anticorpos IgG epítomos variantes (DBPII-Sal1) ou conservados (DEKnull-2) avaliados na população de estudo, durante as fases de alta (I e III) e baixa (II) transmissão de malária. Os resultados foram expressos como Índice de Reatividade (IR) obtidos pelo ensaio de ELISA, sendo os valores individuais representados em círculos abertos na cor azul e vermelha, respectivamente, para DBPII-Sal1 e DEKnull-2. As medianas (linha transversal) e intervalos interquartis (linha longitudinal) foram representados em preto. O estudo envolveu cortes transversais realizados durante fases de alta (I e III) e baixa (II) transmissão de malária. A frequência de soropositivos Pos (%) está representada abaixo do gráfico sendo que os asteriscos indicam diferenças estatísticas pelo teste de X^2 entre as frequências de soropositivos para as duas proteínas em cada corte separadamente.

Tabela 3. Níveis de anticorpos IgG contra as proteínas baseadas na DBPII do *P. vivax* ao longo do estudo de coorte.

IgG	Fase I Alta transmissão			Fase II Baixa transmissão		Fase III Alta transmissão
	Linha de base	6 meses	12 meses	6 anos	7 anos	9 anos
	Mediana (IQR) ¹	Mediana (IQR) ¹	Mediana (IQR) ¹	Mediana (IQR) ¹	Mediana (IQR) ¹	Mediana (IQR) ¹
	vs	vs	vs	vs	vs	vs
DBPII-Sal1	0.7 (0.2-3.7)	0.7 (0.3-2.9)	0.8 (0.3-3.7)	0.2 (0.1-1.2)	0.0 (0.0-0.5)	0.3 (0.2-0.7)
DEKnull-2	0.7 (0.3-4.0)	0.8 (0.2-3.2)	0.8 (0.3-3.7)	0.6 (0.2-3.0)	0.5 (0.1-2.5)	0.6 (0.4-1.6)
Valor de p ²	0.4758	0.9343	0.8528	0.0003	<0.0001	<0.0001

¹A mediana e o Intervalo Interquartil (IQR) dos Índices de Reatividade (IR) foram determinados pelo ensaio de ELISA convencional realizado com o plasma dos indivíduos expostos ao *P. vivax*. O ELISA foi realizado com proteínas recombinantes baseadas na DBPII do *P. vivax* e o IR foi definido como a razão entre a média da densidade ótica (DO) da amostra de plasma e a média da DO do *cut-off*. O *cut-off* foi calculado a partir da média da DO de 20 indivíduos voluntários não-expostos ao *P. vivax* acrescido de dois desvios padrões.

²O valor de p foi obtido pelo teste estatístico de Mann-Whitney.

5.2.3- Razão entre a resposta dos anticorpos IgG e IgM contra a DBPII

Uma vez que a cinética da resposta dos anticorpos IgM foi diferente daquela observada para IgG nos indivíduos estudados, buscou-se avaliar a razão entre estas respostas ao longo dos 9 anos de estudo.

Como mostrado na figura 10, a relação IgG/IgM confirmou que a resposta sorológica contra os epítomos variantes da DBPII (Sal1) foi, predominantemente, associada aos anticorpos IgM. Por outro lado, a resposta contra os epítomos conservados presentes na DEKnull-2 foi, predominantemente, associada aos anticorpos IgG. Esta diferença foi mais nítida no período de baixa transmissão (Figura 1A), onde pode ser observar, por exemplo, que a resposta de anticorpos IgG anti-DBPII-Sal1 foi consideravelmente reduzida enquanto a de anticorpos IgM se manteve estável. Por outro lado, ao longo do estudo, a resposta de IgG foi progressivamente sendo associada aos epítomos conservados (DEKnull-2 > Sal1).

A Figura 10B resume a frequência de resposta para cada antígeno ao longo do estudo. Em conjunto, os resultados demonstram que cerca de 60% dos anticorpos IgM foram direcionados aos epítomos variantes da DBPII, sendo esta proporção de resposta estável ao longo do tempo. De interesse, a prevalência de anticorpos IgG anti-Sal1 diminuiu ao longo do estudo (variando de 40 a 2%), enquanto a de DEKnull-2 aumentou significativamente (55% a 92%).

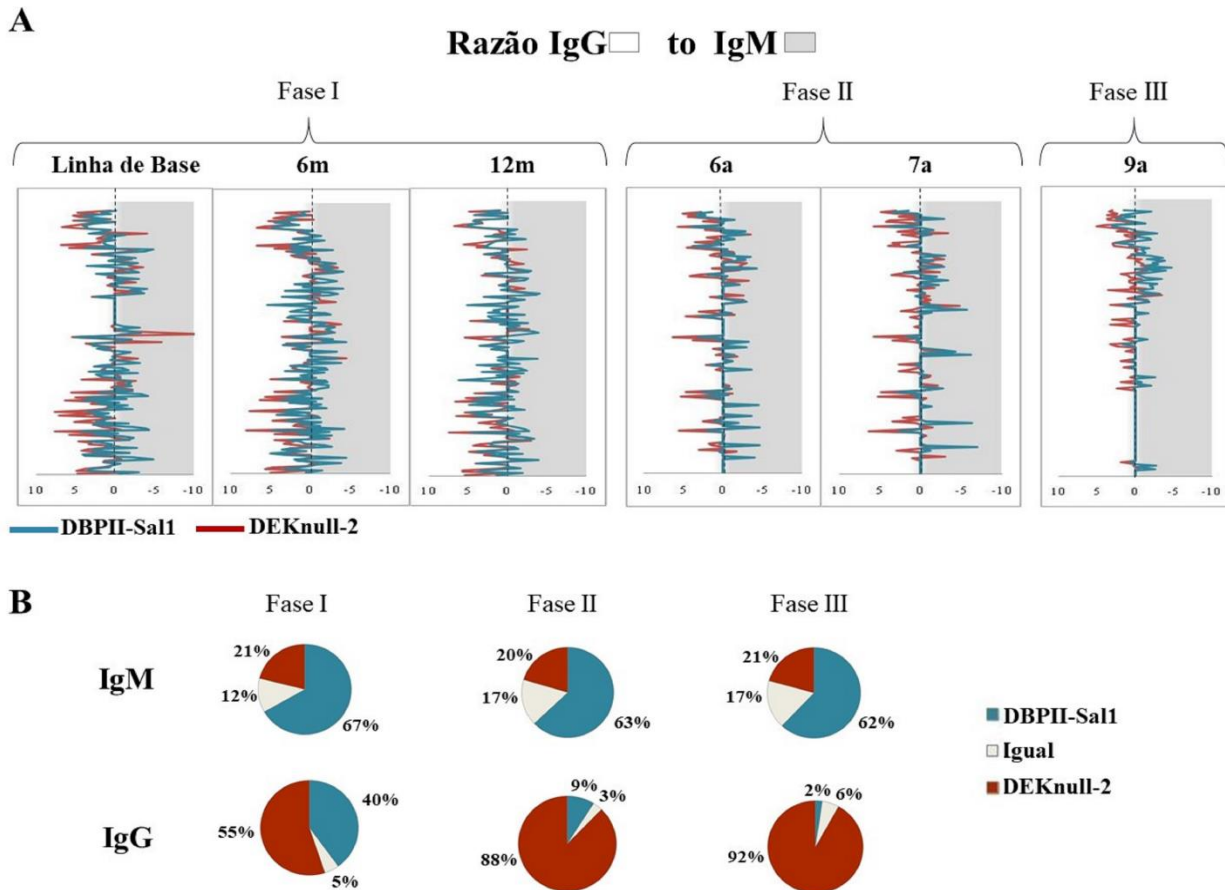


Figura 10. Razão temporal entre as respostas de IgG e IgM dirigidas a epítomos variantes (DBPII-Sal1) ou conservados (DEKnull-2) da DBPII. (A) A razão entre o Índice de Reatividade (IR) de IgG/IgM contra DBPII-Sal1 (linha azul) e DEKnull-2 (linha vermelha) para todos os indivíduos incluídos no estudo (n=163) foi representada em cada corte transversal. O estudo longitudinal compreendeu seis cortes transversais, incluindo períodos de alta (Fase I e III) e baixa (Fase II) transmissão de malária. Os três primeiros cortes foram realizados no primeiro ano (Linha de base, 6 meses e 12 meses) e outros três realizados 6, 7 e 9 anos após o início do estudo. A resposta individual na qual a razão foi favorável para IgG foi representada a esquerda (quadro branco) e a favorável para IgM a direita (quadro cinza). Os indivíduos que apresentaram resposta igual para IgG e IgM foram representados na linha pontilhada central. Os resultados da razão foram transformados em log (2). (B) Os gráficos de pizza representam as porcentagens dos indivíduos que tiveram os seguintes resultados da razão IgG/ IgM, durante as três fases de transmissão diferenciada de malária em Rio Pardo: favorável para DBPII-Sal1 (azul), igual contra ambas as proteínas (branco) e favorável para DEKnull-2 (vermelho).

5.3- Dinâmica da resposta de anticorpos IgM e IgG específicos contra a MSP-1₁₉

Na população de estudo, buscou-se ainda avaliar o perfil longitudinal da resposta de anticorpos IgM vs. IgG contra outro antígeno vacinal, a proteína MSP-1₁₉, que é altamente imunogênica e não polimórfica.

Na figura 11A observa-se que, assim como para as proteínas baseadas na DBPII, a resposta dos anticorpos IgM específicos contra a MSP-1₁₉ também foi relativamente estável ao longo dos 9 anos do estudo. Apesar de pequena redução na frequência de indivíduos respondedores (i.e., 31% na linha de base e 19% no último ano), os níveis de anticorpos IgM permaneceram relativamente estáveis (IR = 0,7 na linha de base e IR = 0,6 no 9º ano; Tabela 4). Além disso, como esperado, a resposta dos anticorpos IgG específicos contra a MSP-1₁₉ variou ao longo do estudo, predominando no primeiro ano onde os níveis de transmissão eram relativamente altos. De fato, cerca de 62 a 70% dos indivíduos estudados apresentaram anticorpos IgG específicos para a MSP-1₁₉ no primeiro ano, enquanto apenas 30% no período de baixa transmissão (Figura 11 B).

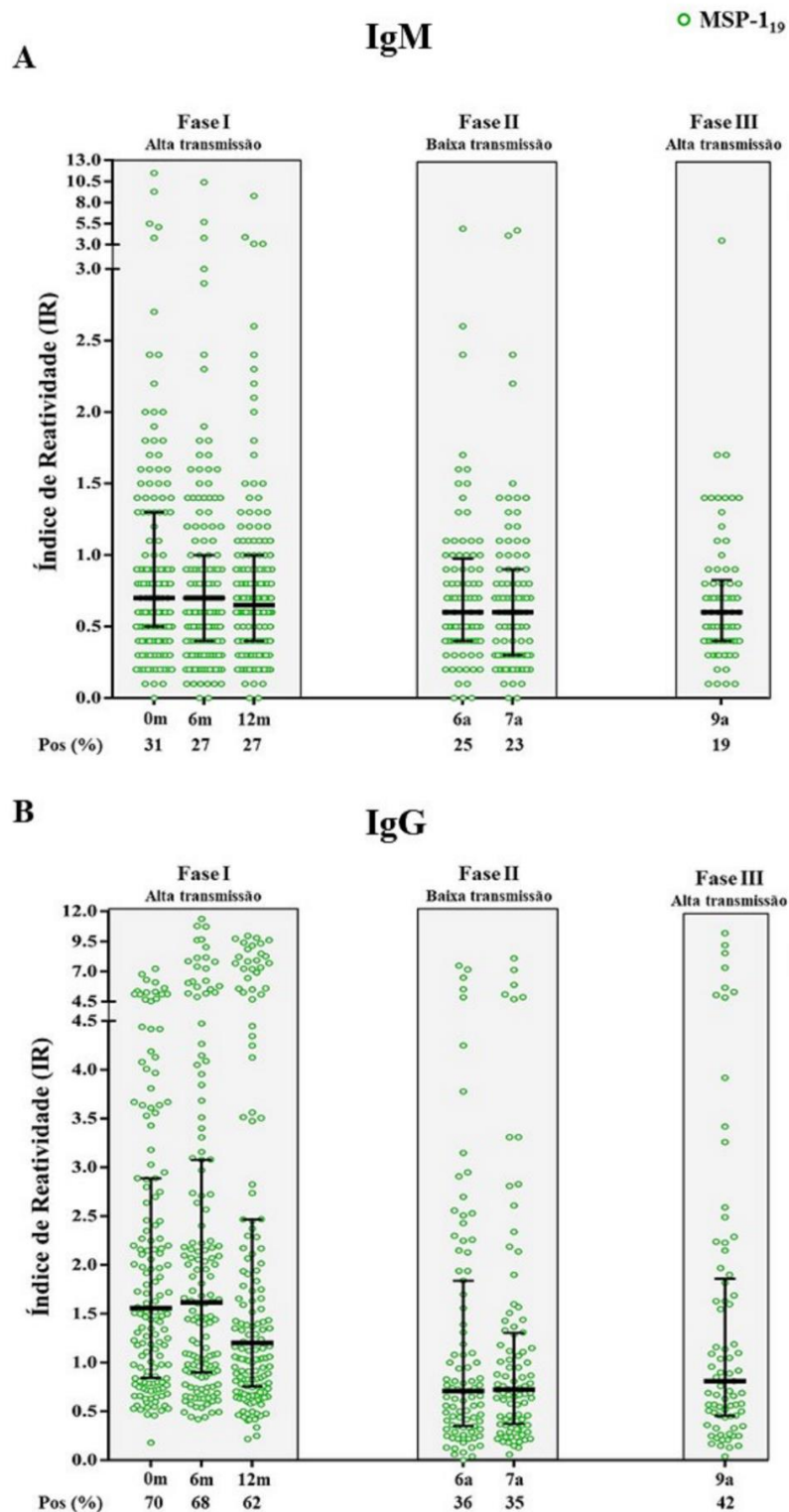


Figura 11. Níveis de anticorpos IgM (A) e IgG (B) específicos contra a MSP-1₁₉ do *P. vivax* avaliados na população de Rio Pardo, AM, durante fases de alta (I e III) e baixa (II) transmissão de malária. Os resultados foram expressos como Índice de Reatividade (IR) no ensaio de ELISA, sendo os valores individuais representados em círculos abertos na cor verde para a MSP-1₁₉. As medianas (linha transversal) e intervalos interquartis (linha longitudinal) foram representados em preto. O estudo longitudinal de coorte aberto abrangeu 6 cortes transversais, três no primeiro ano e outros três 6, 7 e 9 anos após a linha de base do estudo, realizados em fases diferenciadas de transmissão de malária. A frequência de soropositivos Pos (%) para cada corte está representado abaixo do gráfico.

Tabela 4. Níveis de anticorpos IgM e IgG contra a proteína MSP-1₁₉ do *P. vivax* durante os 9 anos do estudo de coorte.

		Fase I Alta transmissão			Fase II Baixa transmissão		Fase III Alta transmissão
		Linha de base	6 meses	12 meses	6 anos	7 anos	9 anos
		Mediana (IQR) ¹	Mediana (IQR) ¹	Mediana (IQR) ¹	Mediana (IQR) ¹	Mediana (IQR) ¹	Mediana (IQR) ¹
MSP-1 ₁₉	IgM	0.7 (0.5-1.3) vs	0.7 (0.4-1.0) vs	0.7 (0.4-1.0) vs	0.6 (0.4-1.0) vs	0.6 (0.3-0.9) vs	0.6 (0.4-0.9) vs
	IgG	1.6 (0.8-2.9)	1.6 (0.9-3.1)	1.2 (0.8-2.5)	0.7 (0.4-1.8)	0.7 (0.4-1.3)	0.8 (0.5-1.7)

¹A mediana e o Intervalo Interquartil (IQR) dos Índices de Reatividade (IR) foram determinados pelo ensaio de ELISA convencional realizado com o plasma dos indivíduos expostos ao *P. vivax*. O ELISA foi realizado com proteínas recombinantes baseadas na DBPII do *P. vivax* e o IR foi definido como a razão entre a média da densidade ótica (DO) da amostra de plasma e a média da DO do *cut-off*. O *cut-off* foi calculado a partir da média da DO de 20 indivíduos voluntários não-expostos ao *P. vivax* acrescido de dois desvios padrões.

5.4- Influência das infecções agudas pelo *P. vivax* no perfil de resposta dos anticorpos IgM e IgG contra as proteínas baseadas na DBPII

Considerando que as infecções agudas estão associadas, em um primeiro momento, com anticorpos do isótipo IgM, buscou-se investigar a influência de parasitos detectados na corrente sanguínea (infecção patente ou subpatente) e a resposta de IgM e IgG contra os epítomos variáveis e conservados da DBPII.

Dos 163 indivíduos estudados, 42 (26%) tiveram uma ou mais amostras positivas para malária durante o estudo, sendo as infecções sanguíneas detectadas pela microscopia ótica (infecção patente) ou pelos ensaios de PCR (subpatente) (Figura 12). A maior parte das infecções malárias ocorreram na fase I do estudo, considerada de maior transmissão da doença na área. Como era de esperar, as infecções subpatentes predominam sobre as infecções patentes, já que estes indivíduos apresentaram história de longa exposição à transmissão. De interesse, o grupo de indivíduos que apresentou malária aguda (n = 42) não se diferenciou da população de estudo (n= 163) em relação a idade (mediana 42 vs 39 anos) ou em relação a proporção homem : mulher (1,3:1 vs 1,1:1). Considerando as variáveis epidemiológicas, o tempo de residência na Amazônia foi similar entre agudos e não agudos (mediana de 34 vs 33 anos, respectivamente), mas a maioria dos indivíduos que se infectaram eram residentes dos igarapés (30 dos 163, 71%).

Em relação a resposta de anticorpos IgM, as infecções maláricas (patente ou subpatente) não influenciou na positividade desta resposta (Figura 12). De fato, indivíduos com infecções persistentes por *P. vivax* (por exemplo, RP553 e RP555) não apresentaram resposta de anticorpos IgM contra epítomos conservados ou variáveis da DBPII; por outro lado, aqueles indivíduos com resposta persistente de IgM contra ambas proteínas (por exemplo RP416 e RP516) não apresentaram infecções sanguíneas detectáveis. Perfil similar foi detectado para os anticorpos IgG (Figura 12).

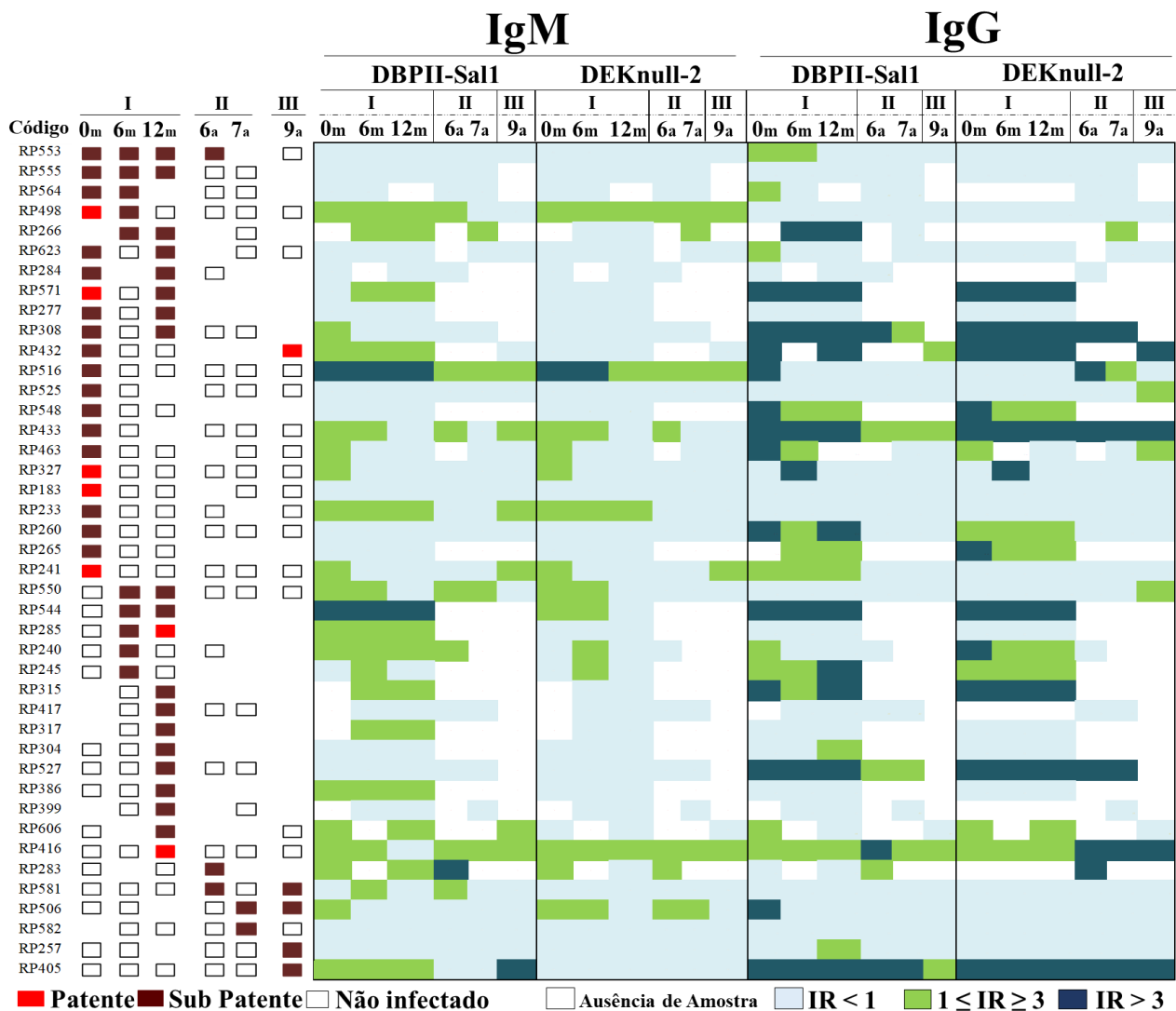


Figura 12. Perfil da resposta de IgM e IgG dos 42 indivíduos que apresentaram infecção patente ou subpatente por *P. vivax* em algum momento do estudo longitudinal (Linha de base a 9 anos). O estudo longitudinal compreendeu seis cortes transversais ao longo de 9 anos incluindo períodos de alta (fase I e III) e baixa (fase II) transmissão de malária. Os três primeiros cortes foram realizados durante o 1º ano (linha de base, 6 e 12 meses) e outros três realizados 6, 7 e 9 anos após o início do estudo. Cada linha representa um indivíduo, sendo que as infecções pelo *P. vivax* foram classificadas como patentes (vermelho claro) ou subpatentes (vermelho escuro) em função da positividade pela microscopia convencional ou por ensaio de PCR, respectivamente. Os resultados dos ensaios sorológicos de ELISA para anticorpos IgM e IgG estão representados por painéis do tipo “mapa-de-calor”, onde a cor azul representa resultado negativo ($IR < 1$) e os valores positivos na escala verde/Azul ($IR > 1$). O Índice de Reatividade (IR) do ELISA foi calculado através da razão entre a média da DO de cada amostra e a média da DO + 2 desvios padrões de amostras de voluntários não expostos. Os espaços em branco no mapa de calor significam ensaio não realizado (amostra não disponível).

Além disto, os ensaios de correlação confirmaram não haver associação (positiva ou negativa) entre a resposta de anticorpos IgM e IgG para qualquer uma das proteínas estudadas (correlação de Spearman, $p > 0.05$) (Figura 13). Esta ausência de correlação não foi associada a presença ou ausência de malária aguda.

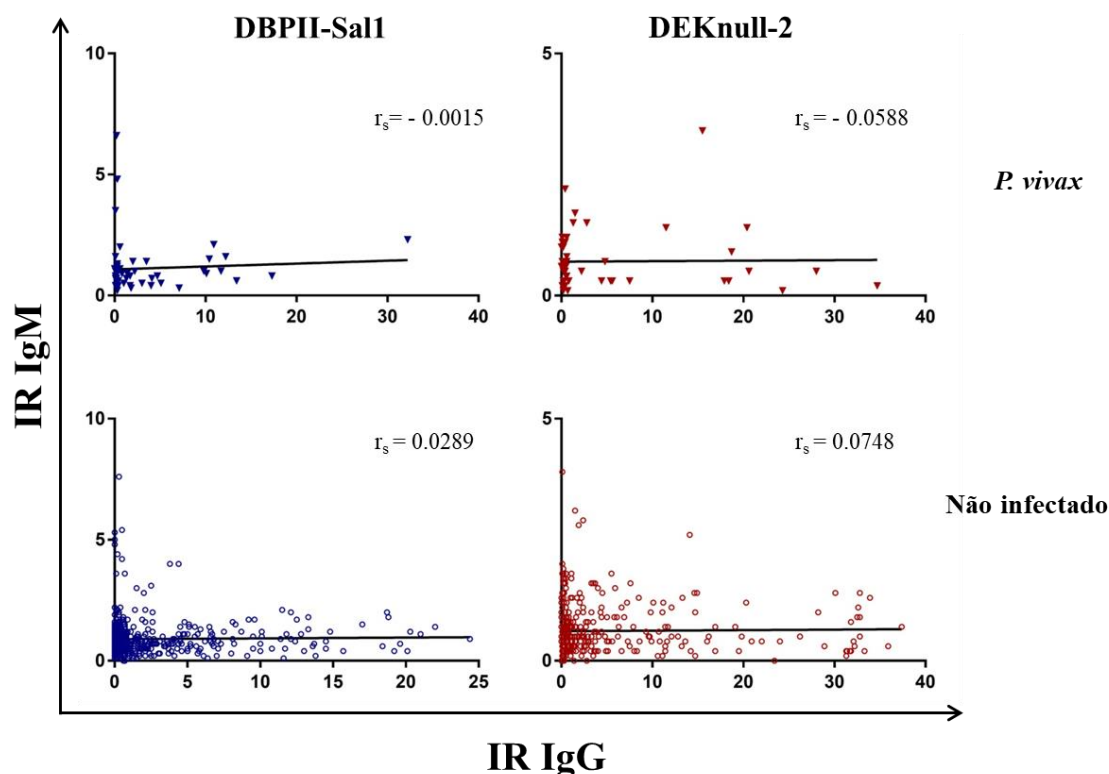


Figura 13. Ausência de correlação entre as respostas de anticorpos IgM e IgG contra antígenos da DBPII. Para a análise, os indivíduos foram subdivididos em função da presença (*P. vivax*, painéis superiores, triângulos fechados) ou ausência de malária aguda (Não infectado, painéis inferiores, círculos abertos). Para cada uma das proteínas, DBPII-Sal1 (azul) e DEKnull-2 (vermelho), os níveis de anticorpos IgM e IgG detectados no ELISA (Índice de reatividade, IR) foram analisados pela Correlação de Spearman, sendo os valores do coeficiente de correlação (r_s) incluído em cada gráfico.

5.5- Influência das infecções agudas pelo *P. vivax* no perfil de resposta dos anticorpos IgM e IgG contra a proteína MSP-1₁₉

Visando avaliar se o perfil de resposta sorológico era específico das proteínas DBPII, buscou-se avaliar a resposta de IgM e IgG contra uma proteína imunogênica do *P. vivax*, como a MSP-1₁₉. Os resultados demonstram que a resposta de anticorpos IgM anti-MSP-1₁₉ também não se correlacionou com a presença e ou persistência de infecções agudas pelo *P. vivax* (Figura 14A). No entanto a maior frequência de anticorpos IgG ocorreu no primeiro ano do estudo, período de maior transmissão de malária na área. A resposta de IgM não se correlacionou com a de IgG (correlação de Spearman, $p > 0.05$) (Figura 14B) nos indivíduos com infecções agudas, nem naqueles sem infecção detectável pelo *P. vivax*.

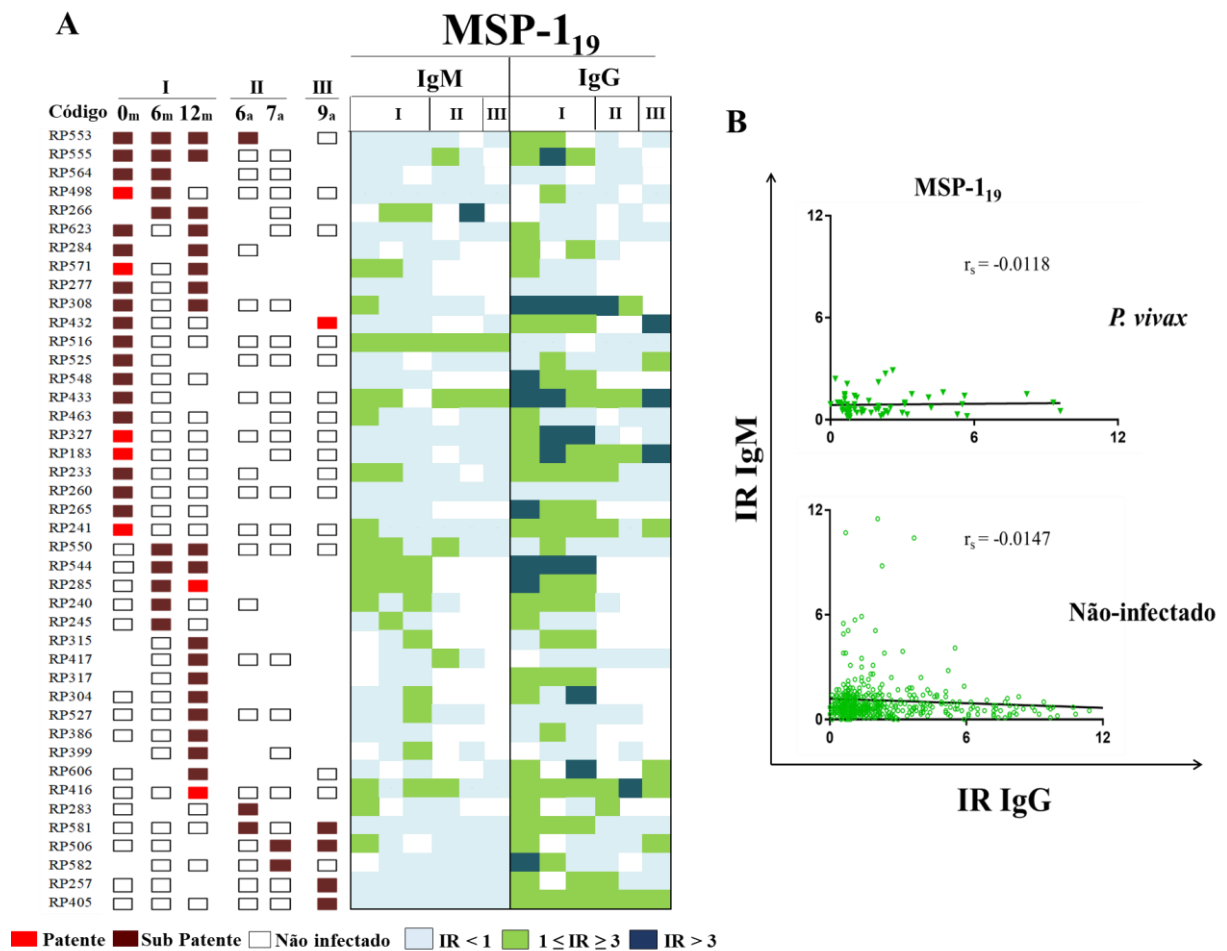


Figura 14. Resposta de anticorpos IgM e IgG anti-MSP-1₁₉ dos 42 indivíduos que apresentaram infecção aguda por *P. vivax* em algum momento do estudo longitudinal. No painel à esquerda (A) cada linha representa um indivíduo, sendo que as infecções pelo *P. vivax* foram classificadas como patentes (vermelho claro) ou subpatentes (vermelho escuro) em função da positividade pela microscopia convencional ou por ensaio de PCR, respectivamente. Os resultados dos ensaios sorológicos de ELISA para anticorpos IgM e IgG estão representados por painéis do tipo “mapa-de-calor”, onde a cor azul representa resultado negativo (IR<1) e os valores positivos na escala verde/Azul (IR>1). O Índice de Reatividade (IR) do ELISA foi calculado através da razão entre a média da DO de cada amostra e a média da DO + 2 desvios padrões de amostras de voluntários não expostos. Os espaços em branco no mapa de calor significam ensaio não realizado (amostra não disponível). No gráfico à direita (B) os indivíduos foram subdivididos em função da presença (*P. vivax*, painéis superiores, triângulos fechados) ou ausência de malária aguda (Não infectado, painéis inferiores, círculos abertos) e os níveis de anticorpos IgM e IgG detectados no ELISA foram analisados pela Correlação de Spearman, sendo os valores do coeficiente de correlação (r_s) incluídos em cada gráfico.

5.6- Perfil da resposta de anticorpos IgM e IgG contra a DBPII em função da resposta de anticorpos inibitórios da interação DBPII/DARC

Considerando que anticorpos inibitórios da interação DBPII-DARC (BIAbs) podem ser indicadores de proteção clínica, avaliou-se aqui a relação entre as respostas de anticorpos IgG/ IgM e o perfil de BIAbs. Devido as dificuldades de se conduzir ensaios funcionais *in vitro*, uma amostra representativa da população estudada, incluindo apenas indivíduos que contribuíram com amostras na fase I e II (n = 57), foi avaliada quanto a atividade dos BIAbs. Os resultados do acompanhamento longitudinal permitiu a classificação destes em três grupos distintos (Figura 15): i) respondedores persistentes (**RP**), que tiveram resposta de BIAbs de longa-duração; ii) respondedores temporários (**RT**), que tiveram resposta variável de BIAbs durante o estudo (positiva ou negativa e vice-versa) e iii) não respondedores (**NR**), aqueles que não tiveram BIAbs detectáveis em nenhum momento do estudo.

Como pode ser observado na figura 15, a resposta de IgG do grupo BIAbs persistentes (PR) foi estável para ambas as proteínas, mesmo no período de baixa transmissão de malária (Fase II). Por outro lado, a estabilidade e amplitude da resposta de IgG diminuiu progressivamente em função da menor atividade de BIAbs (PR > TR > NR). Nos mesmos indivíduos, nenhuma associação clara foi obtida entre a resposta dos anticorpos IgM e a presença ou persistência dos BIAbs.

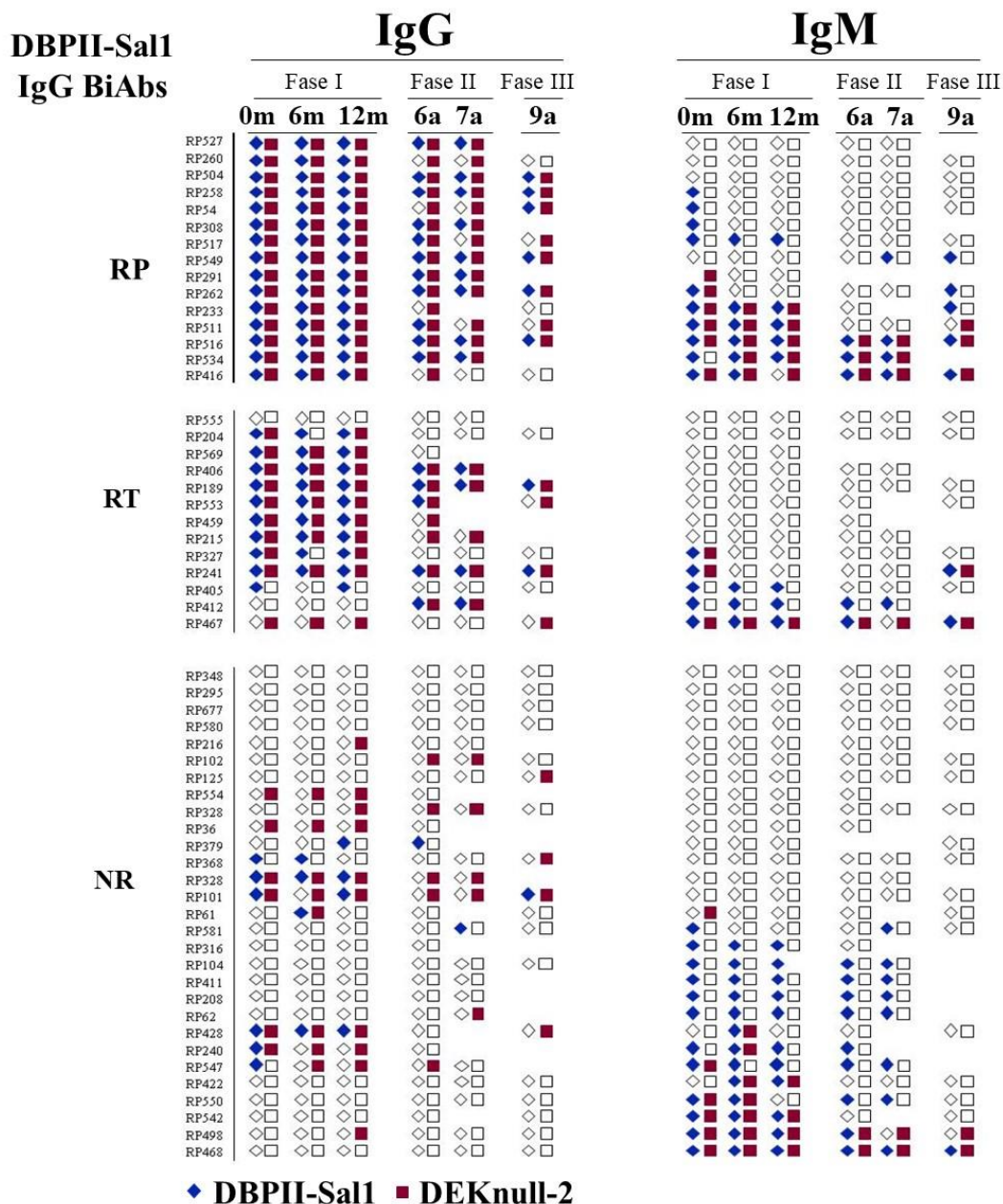


Figura 15. Perfil de resposta dos anticorpos IgM e IgG específicos para epítópos variantes (DBPII-Sal1) e conservados (DEKnull-2) nos indivíduos estudados segundo o status de anticorpos inibitórios de ligação DBPII-DARC (BIAbs). De acordo com a detecção de BIABs, indivíduos (n=57) foram classificados como (Ntumngia *et al.*, 2017): i) Respondedores persistentes (RP), que tiveram resposta de BIABs de longa-duração; ii) Respondedores temporários (RT), que tiveram resposta variável de BIABs durante o estudo e iii) Não respondedores (NR), que não tiveram BIABs detectáveis em nenhum momento do estudo. Cada linha representa a resposta individual de anticorpos IgM e IgG contra a DBPII-Sal1 (azul) e DEKnull-2 (vermelho), como detectado pelo ensaio sorológico de ELISA. Os resultados do ELISA foram representados como Índice de Reatividade (IR), com $IR \geq 1$ considerado positivo. Os símbolos coloridos indicam resposta de anticorpo positiva no ELISA e os símbolos brancos resposta negativa.

5.7- Avaliação da avidéz dos anticorpos IgM e IgG contra as proteínas DBPII

Por último, buscou-se caracterizar a avidéz (força da ligação antígeno-anticorpo) das respostas de IgM/IgG anti-DBPII, com ênfase no grupo previamente caracterizado quanto ao status imunológico de BIAbs (item 5.6). Entre os 57 indivíduos avaliados para atividade BIAbs, 29 foram avaliados pela avidéz, pois apenas este grupo apresentou anticorpos IgG e/ou IgM detectáveis no item anterior.

Em geral, os anticorpos IgG para a DBPII-Sal1 foram de alta avidéz (> 90%) quando comparado aos anticorpos IgM (Figura 16A). Apesar disto, a avidéz dos anticorpos IgM pode ser classificada também como elevada (> 60%, segundo Zakeri *et al.*, 2011 onde valores até 30% são classificados como baixa avidéz, de 30 a 50% média avidéz e acima de 50% alta avidéz). Além disso, a força de interação entre estes anticorpos e a Sal1 parece não ter sido influenciada pela intensidade de transmissão de malária na região, uma vez que não houve variações significativas na avidéz desses anticorpos (IgG e IgM) ao longo do estudo. Perfil similar foi obtido para a DEKnull-2 (Figura 16B).

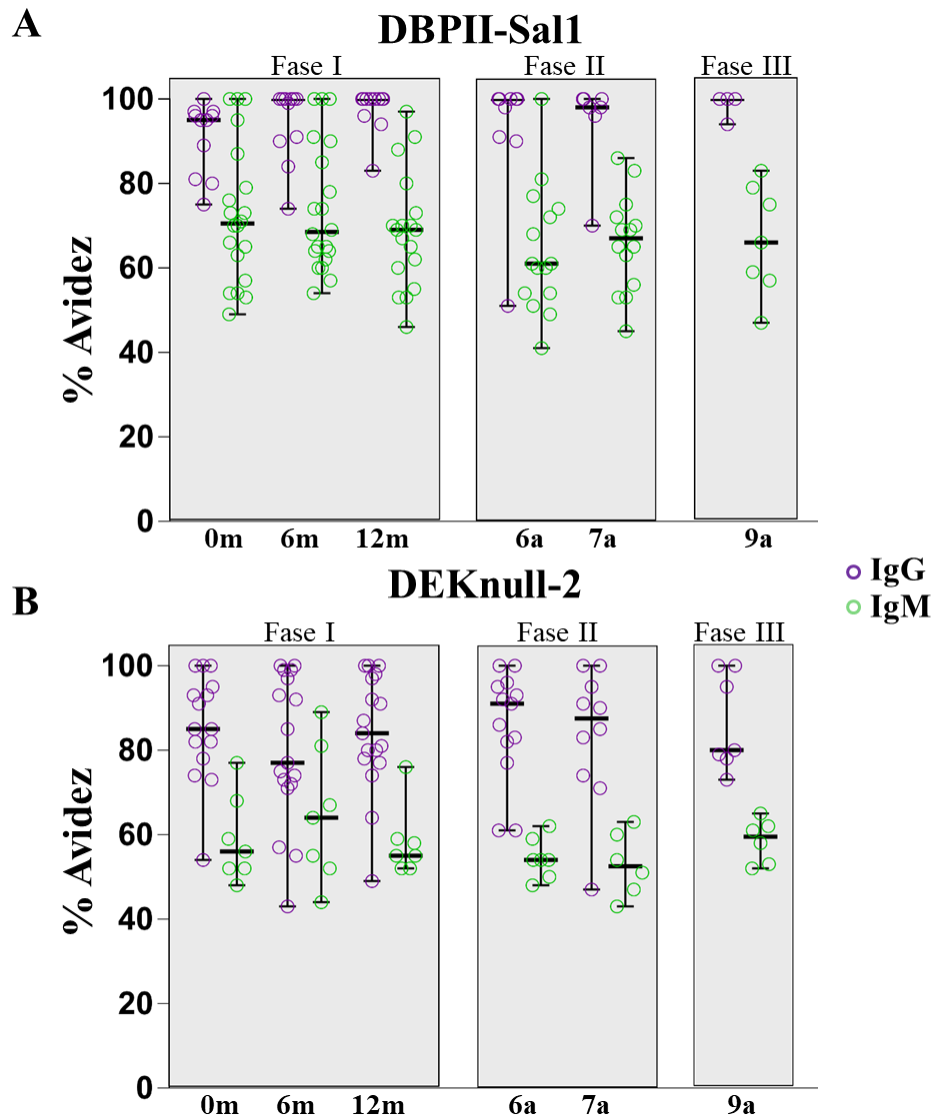


Figura 16. Avidéz da ligação entre os anticorpos IgM e IgG dos indivíduos de Rio Pardo e os epítomos variantes (DBPII-Sal1) (A) e conservados (DEKnull-2) (B) da DBPII durante fases de alta (I e III) e baixa (II) transmissão de malária. A avidéz dos anticorpos IgM (círculo aberto roxo) e IgG (círculo aberto verde) foi representada em % Avidéz que significa a razão entre a DO da amostra sob efeito do agente caotrópico e a DO da amostra sem o agente caotrópico x 100. As linhas pretas longitudinais indicam os intervalos interquartis e as linhas transversais indicam as medianas. Os resultados obtidos (n = 29) foram representados ao longo dos nove anos de estudo, abrangendo fases de alta transmissão (fase I e III) e baixa transmissão de malária (fase II).

Finalmente, buscou-se avaliar se a presença e/ou persistência dos anticorpos BIABs influenciaria na avidéz dos anticorpos IgM/IgG específicos (Figura 17). Os resultados mostraram que a avidéz destes anticorpos independeu do status de BIABs previamente definido, sendo similar nos grupos PR, TR ou NR. Os resultados confirmaram ainda que em todos os grupos a avidéz da resposta de IgG foi maior que a IgM.

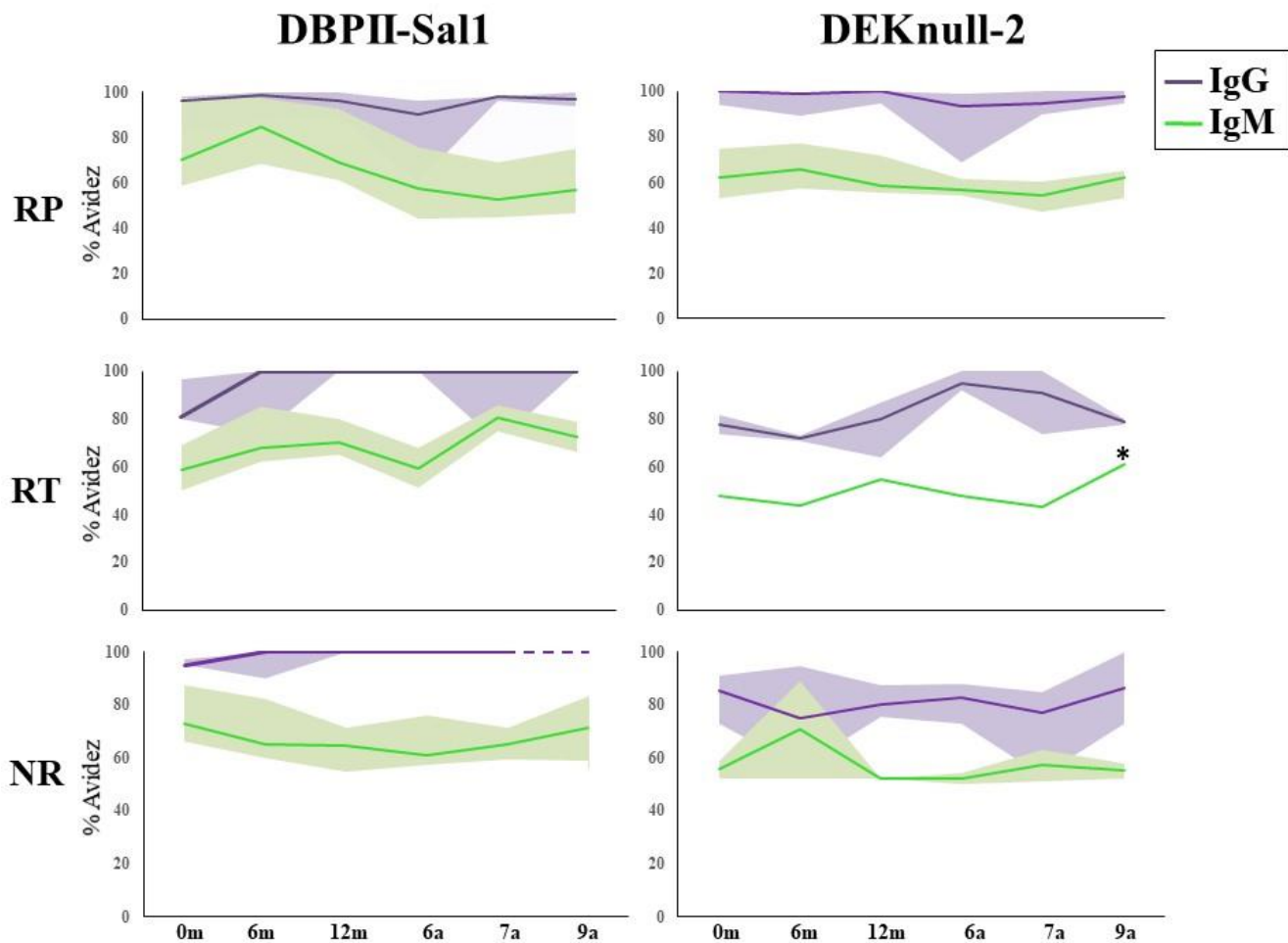


Figura 17. Avidéz entre os anticorpos IgM e IgG e as proteínas baseadas na DBPII nos indivíduos de Rio Pardo classificados conforme o status de anticorpos inibitórios da ligação DBPII-DARC (BIAbs). A mediana da avidéz entre os anticorpos IgM (linha verde) e IgG (linha roxo) e os epítomos variáveis (DBPII-Sal1) e conservados (DEKnull-2) da DBPII dos indivíduos previamente classificados de acordo com o status imunológico de BIAbs (n=29) foi representada ao longo dos 9 anos do estudo longitudinal. Os indivíduos foram classificados previamente em (Ntumngia *et al.*, 2017): **(RP)** Respondedores Persistentes – Resposta estável de BIAbs, **(RT)** Respondedores Temporários – Resposta variável de BIAbs, **(NR)** Não Respondedores – Não apresentaram resposta de BIAbs durante o estudo. A avidéz foi representada em % Avidéz que significa a razão entre a DO da amostra sob efeito do agente caotrópico e a DO da amostra sem o agente caotrópico x 100. A área sombreada em verde (IgM) e roxa (IgG) representa o intervalo interquartil da % de Avidéz da amostra populacional. O asterisco indica que a amostra foi composta de apenas 1 indivíduo e a linha tracejada representa a ausência de amostra em determinado período.

6- Discussão

Visando contribuir para o entendimento da imunidade naturalmente adquirida de longa duração contra os protótipos vacinais baseados na DBPII, buscou-se aqui caracterizar a resposta dos anticorpos IgG e IgM contra epítomos variantes (DBPII-Sal1) e conservados (DEKnull-2) da proteína. Para isto, o estudo incluiu uma avaliação retrospectiva de indivíduos expostos à malária na Amazônia, cujos inquéritos imuno-epidemiológicos foram realizados durante os anos de 2008 a 2017, incluindo períodos de alta e baixa transmissão de malária na área.

Em linhas gerais a resposta dos anticorpos IgM foi mais frequentemente associada a uma resposta do tipo variante-específica, caracterizada aqui pela resposta contra os epítomos variantes da DBPII-Sal1. Neste contexto, os resultados sugerem que em uma área com transmissão instável e variável de *P. vivax*, a resposta de anticorpos IgM parece ser predominante para a variante majoritária na região. De fato, estudos anteriores confirmaram que na comunidade de Rio Pardo, a Sal1 foi altamente prevalente, sendo responsável por cerca de 50% dos casos de malária detectados (Kano *et al.*, 2012). De interesse, o perfil da resposta de anticorpos IgM foi mantido durante todo o acompanhamento longitudinal, mesmo nos anos nos quais a transmissão de malária caiu drasticamente na região (Fase II). Em conjunto, esses resultados sugerem que a resposta de anticorpos IgM específicos contra a DBPII nos indivíduos expostos ao *P. vivax* é de longa-duração, mesmo em áreas de transmissão hipoendêmica.

Os resultados aqui apresentados permitiram concluir ainda que a resposta de anticorpos IgM de longa-duração não foi exclusiva das proteínas DBPII, já que perfil semelhante foi detectado para anticorpos IgM contra outra proteína do *P. vivax*, a MSP-1₁₉, que não é polimórfica e é altamente imunogênica (Wang *et al.*, 2016). Entretanto, os dados aqui apresentados não permitem concluir se esta resposta de anticorpos anti-*P. vivax* está sendo mantida na ausência de “booster” (i.e., devido a presença de células plasmáticas de vida longa e/ou células B de memória) ou se depende de exposição continuada ao antígeno (Bohannon *et al.*, 2016; Borges Da Silva *et al.*, 2018). Neste sentido, em modelos de malária murina, foi demonstrado que baixos níveis parasitários em infecções crônicas podem fornecer antígenos suficientes para manter plasmablastos IgM⁺ na medula óssea (Winter *et al.*, 2012; Papillion *et al.*, 2017).

Até o momento, poucos estudos longitudinais foram conduzidos para avaliar a duração da resposta secundária de anticorpos IgM nas infecções maláricas e, principalmente naquelas causadas pelo *P. vivax*. Apesar disto, anticorpos IgM específicos contra antígenos do *P. falciparum* foram detectados por no mínimo 6 meses em Australianos retornando de áreas endêmicas (Boyle *et al.*, 2019). Outros autores demonstram que anticorpos IgM contra antígenos do *P. vivax* permaneceram por cerca de 30 dias após a infecção aguda e o tratamento (Patgaonkar *et al.*, 2018). Infelizmente, nenhum estudo até o momento acompanhou esta resposta por períodos longos, como o aqui descrito (cerca de 9 anos). Em resumo, todos esses achados reforçam o novo paradigma da resposta secundária de IgM antígeno-específica, onde estes anticorpos

parecem ser de alta afinidade e a resposta de longa-duração (Boonyaratanakornkit & Taylor, 2019).

No que concerne a dinâmica de resposta dos anticorpos IgG contra a DBPII, o perfil observado foi diferente do perfil de resposta dos anticorpos IgM descrito acima, sendo que a flutuação nos níveis de transmissão de malária em Rio Pardo foi fundamental para elucidar a contribuição relativa dos anticorpos IgG vs IgM na composição da resposta imune contra a DBPII. Neste contexto, foi possível demonstrar que anticorpos IgG direcionados contra os epítomos variantes da Sal1 foram influenciados pelos níveis de transmissão local, sendo mais indicativos dos níveis de transmissão de malária na área (Pires *et al.*, 2018). De fato, anticorpos IgG anti-Sal1 diminuíram progressivamente com a redução dos níveis de transmissão na área, sendo substituídos por anticorpos IgG contra os epítomos conservados presentes na DEKnull-2. Estes achados ressaltam que nesta população, com histórico de longa-exposição à malária, anticorpos anti-DEKnull-2 se mantêm independente dos níveis de transmissão. Esses resultados já eram esperados, pois nosso grupo demonstrou que a resposta de IgG anti-DEKnull-2 uma vez adquirida é estável e de longa-duração (Ntumngia *et al.*, 2017; Pires *et al.*, 2018).

De interesse, os dados aqui apresentados demonstram ainda uma ausência de correlação entre os níveis dos anticorpos IgM e IgG contra a DBPII. Na malária, tem sido proposto que a correlação (ou não) entre anticorpos IgG/IgM pode variar em função das diferenças estruturais entre os antígenos do parasito. Pode se citar, como exemplo, os estudos que demonstraram associação entre a resposta de anticorpos IgG e IgM para a proteína MSP-2, mas nenhuma correlação para a MSP-1₁₉ ou AMA-1 (Stanisic *et al.*, 2015). De fato, no presente trabalho não foi observada correlação entre a resposta dos anticorpos IgG e IgM anti-MSP-1₁₉ do *P. vivax*. Além disto, parece que regiões/epítomos diferentes de um mesmo antígeno pode ter um comportamento diferente; no caso da MSP-1₁₉ a porção N-terminal esta predominantemente associada com anticorpos IgM, enquanto a C-terminal com anticorpos IgG (Soares *et al.*, 1999; Cassiano *et al.*, 2016). Em relação a DBPII, diversos estudos tem mapeado os epítomos funcionais e imunorreativos de células B associados com resposta de anticorpos IgG (Chootong *et al.*, 2010; Ntumngia *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016; George *et al.*, 2019), mas não há dados disponíveis sobre os epítomos específicos para a resposta de IgM. Estudos futuros fazem-se necessário neste sentido.

Historicamente, sabe-se que a presença de infecções agudas pode alterar o perfil de resposta humoral, principalmente dos anticorpos IgM que são rapidamente produzidos após exposição ao patógeno (revisto por Eisen, 2014; revisto por Pleass *et al.*, 2015). Assim, investigou-se aqui se uma nova exposição às formas sanguíneas do *P. vivax* (infecção, recaída e/ou recorrência) poderia ser suficiente para fazer um “booster” da resposta dos anticorpos IgM e/ou IgG anti-DBPII. Os resultados demonstraram que a infecção aguda (patente ou subpatente) não influenciou na resposta de IgM e/ou IgG. As razões para a falta de correlação entre infecções agudas e resposta de anticorpos IgM/IgG não são conhecidas. Apesar disto, pode-se especular que diferentes fatores não mutuamente exclusivos poderiam explicar este resultado. A primeira hipótese é a de que

as novas infecções sanguíneas podem ter sido causadas por outras variantes da DBPII que não foram contempladas nos antígenos aqui estudados. Entretanto, esta hipótese não explica grande parte das infecções, já que a Sal1 é uma variante prevalente na área de estudo (Kano *et al.*, 2012).

Uma outra possibilidade para explicar a falta de “booster” na resposta de anticorpos durante a infecção sanguínea é que as baixas densidades parasitárias podem não ter sido suficientes para aumentar os níveis de anticorpos. De fato, nos indivíduos estudados houve predomínio de infecções subpatentes (77% por PCR vs 23% por microscopia). Entretanto, achados na malária experimental demonstraram que a resposta secundária de IgM não parece ser influenciada pela dose do antígeno utilizada no desafio (Krishnamurty *et al.*, 2016). Neste contexto, a explicação mais plausível para a falta de associação entre parasitemia e “booster” da resposta de anticorpos, pode ser a localização tecidual de grande parte das formas sanguíneas do *P. vivax*. Isto porque achados recentes têm confirmado a presença frequente do parasito em órgãos como a medula óssea (Obaldia *et al.*, 2018) e o baço (revisto por Silva-Filho *et al.*, 2020). Dessa maneira, os parasitos circulantes podem não refletir a carga parasitaria verdadeira do indivíduo, já que grande parte dos parasitos pode estar localizado em nichos hematopoiéticos fora da circulação sanguínea (Lopes *et al.*, 2014; Barber *et al.*, 2015; Silva-Filho *et al.*, 2020).

Em estudos anteriores foi demonstrado que indivíduos com níveis elevados e persistentes de anticorpos IgG para a DEKnull-2 eram capazes de produzir uma resposta duradoura de anticorpos capazes de bloquear a interação DBPII-DARC (BIAbs) (Ntumngia *et al.*, 2017). Nesta próxima etapa, fez-se necessário avaliar se a resposta de anticorpos IgM anti-DBPII influenciava na presença e/ou persistência da resposta de BIAbs, já que os anticorpos neutralizantes estão associados à proteção clínica (King *et al.*, 2008; Nicolette *et al.*, 2016). Os resultados aqui apresentados não permitiram identificar associação (positiva ou negativa) entre a resposta de IgM e a presença e/ou persistência da atividade de BIAbs. Estudos futuros deverão ser conduzidos para definir o papel dos anticorpos IgM anti-DBPII na resposta imune mediada pelo *P. vivax*. Isto é particularmente relevante, já que tem sido sugerido que os anticorpos IgM podem ser necessários para sustentar uma resposta protetora ótima de longa duração dos anticorpos IgG em diferentes infecções, como por exemplo, virais (West Nile vírus) e na própria malária murina (Harte *et al.*, 1983; Boes *et al.*, 1998; Diamond *et al.*, 2003).

Devido à ausência de correlação entre a resposta de anticorpos IgM anti-DBPII e a atividade de BIAbs, buscou-se avaliar a avidéz dos anticorpos IgM, isto é, a força de ligação total antígeno-anticorpo (Hedman *et al.*, 1993). Considerando os critérios utilizados de classificação da intensidade da avidéz dos anticorpos utilizada por estudos anteriores (Zakeri *et al.*, 2011), nenhuma amostra do nosso estudo apresentou baixa ou média avidéz (i.e., abaixo de 50% após tratamento com ureia). De importância, este perfil se manteve ao longo de todo estudo, mesmo nos períodos de baixa transmissão de malária. Em conjunto, os resultados aqui apresentados confirmaram elevada avidéz dos anticorpos IgM antígeno-específicos, tanto contra epítomos conservados quanto variantes da DBPII. Esses resultados podem, mesmo que indiretamente, reforçar os achados recentes que

sugerem que as células B de memória IgM⁺ sofrem hipermutações somáticas levando, subsequente, a seleção clonal e produção de anticorpos IgM de alta afinidade (revisto por Gatto & Brink 2010; Bohannon *et al.*, 2016; Borges Da Silva *et al.*, 2018)

Apesar da avidéz relativamente elevada dos anticorpos IgM antígeno-específicos, as taxas foram, em geral, inferior aquelas detectadas para os anticorpos IgG. Mais especificamente, o tratamento com um agente dissociador do complexo antígeno-anticorpo (ureia) teve pouca influência na interação IgG-antígeno, sendo as taxas de avidéz das amostras aqui estudadas $\geq 80\%$. Até o momento, um único estudo avaliou a avidéz de anticorpos contra a proteína DBP do *P. vivax* (Zakeri *et al.*, 2011). Estes autores demonstraram que apenas cerca de 40% de indivíduos estudados tinham resposta de anticorpos IgG considerada de alta avidéz contra a DBP. A razão para a discrepância dos resultados de Zakeri e colaboradores (2011) com os aqui descritos não é conhecida, mas pode ser atribuída, em parte, a diferença nos antígenos utilizados e nos protocolos de avidéz. Enquanto o estudo de Zakeri e colaboradores (2011) utilizou a região I e IV da DBP, o presente estudo utilizou a região II, que é a região do ligante aos eritrócitos. Além disso, no presente trabalho, após a titulação da concentração de ureia a ser utilizada nos ensaios, optou-se pela concentração ideal de 5M. Por outro lado, nos estudos de Zakeri e colaboradores a concentração utilizada foi de 8M. Deve-se ter cautela ao comparar as taxas de avidéz com qualquer estudo da literatura visto que existe uma gama de protocolos para o estudo da avidéz e, embora a maioria utilize o ensaio de ELISA com adição do agente caotrópico, como o realizado no presente trabalho, as concentrações são variáveis (Ferreira *et al.*, 1996; Leoratti *et al.*, 2008; Zakeri *et al.*, 2011; Ibison *et al.*, 2012). Infelizmente, no estudo de Zakeri e colaboradores (2011) a avidéz de anticorpos IgM não foi estudada. De interesse ainda, o estudo aqui desenvolvido empregou um protótipo vacinal baseado em regiões conservadas da DBP (DEKnull-2), cuja resposta foi associada a anticorpos de alta avidéz. Estes achados reforçam o potencial da DEKnull-2 como protótipo vacinal. Por último, vale a pena ressaltar que em estudos de vacina é fundamental avaliar a avidéz dos anticorpos antígeno-específico, pois isto poderá auxiliar em uma possível correlação entre imunidade e proteção clínica, como já propostos em doenças virais e bacterianas (Schlesinger & Granoff, 1992; Bachmann *et al.*, 1997; Goldblatt *et al.*, 1998; Maynard *et al.*, 2002). Em relação à malária, embora o aumento da avidéz de anticorpos IgG contra antígenos do *P. falciparum* já foi correlacionada no passado com proteção clínica (Ferreira *et al.*, 1996), poucos estudos tem sido desenvolvido neste sentido (Ferreira *et al.*, 1996; Leoratti *et al.*, 2008), com resultados contraditórios em humanos e modelos experimentais (Ibison *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2012; Ann *et al.*, 2019). Apesar disto, os achados aqui apresentados fornecem as bases iniciais para o entendimento do papel da avidéz dos anticorpos envolvidos na resposta imune de longa-duração na imunidade contra a malária.

Em resumo nossos resultados demonstram que em populações continuamente expostas a níveis baixos e instáveis de transmissão de malária, a resposta de anticorpos IgM específicos contra epítomos variantes e conservados da DBPII é de longa-duração. Enquanto a resposta de IgM foi, predominantemente, associada a epítomos variantes da

DBPII, a resposta de IgG se direcionou aos epítomos conservados da proteína que parecem estar associados a resposta de BIAbs. Este perfil de resposta IgM/IgG não foi influenciado pela presença de parasitos circulantes. A razão para a persistência da resposta dos anticorpos IgM específico contra o *P. vivax* em nosso estudo longitudinal merece investigações futuras uma vez que tal isótipo pode ser relevante na resposta imunológica contra a malária, podendo contribuir para o aprimoramento do desenvolvimento de vacinas baseadas na DBPII.

7- Conclusões

- A resposta dos anticorpos IgM contra epítomos variantes (Sal1) e conservados (DEKnull-2) da DBPII do *P. vivax* se manteve relativamente estável durante o estudo longitudinal, sendo a resposta independente dos níveis de transmissão de malária na área estudada;
- Este perfil de resposta dos anticorpos IgM não é exclusivo contra a DBPII uma vez que também foi verificado contra a MSP-1₁₉;
- A resposta dos anticorpos IgG voltada para os epítomos variáveis e conservados da DBPII variou em função dos níveis de transmissão do *P. vivax* na região; a diminuição da resposta de anticorpos IgG aos epítomos variantes foi acompanhada por um aumento dos anticorpos contra epítomos conservados da DEKnull-2;
- As infecções agudas não interferiram no perfil de resposta humoral contra a DBPII nem mesmo contra a MSP-1₁₉. Independente da presença de parasitos circulantes, a resposta de IgM não se correlacionou com a de IgG;
- A presença ou persistência da resposta de anticorpos IgM DBPII-específicos não se correlacionou com o perfil da resposta de anticorpos inibitórios da interação DBPII-DARC;
- A avidéz do complexo anticorpo-DBPII foi elevada para ambos isótipos de imunoglobulinas, sendo aquela detectada para anticorpos IgG maior que para os anticorpos IgM.

8- Referências Bibliográficas

ADAMS, J. H. et al. The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. **Cell**, v. 63, n. 1, p. 141-53, Oct 1990. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2170017> >.

ADAMS, J. H.; MUELLER, I. The Biology of. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 7, n. 9, Sep 2017. ISSN 2157-1422. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28490540> >.

ADAMS, J. H. et al. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 15, p. 7085-9, Aug 1992. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1496004> >.

ADAPA, S. R. et al. *Plasmodium vivax* readiness to transmit: implication for malaria eradication. **BMC Syst Biol**, v. 13, n. 1, p. 5, 01 2019. ISSN 1752-0509. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30634978> >.

ADEMOLUE, T. W.; AWANDARE, G. A. Evaluating antidisease immunity to malaria and implications for vaccine design. **Immunology**, v. 153, n. 4, p. 423-434, 04 2018. ISSN 1365-2567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29211303> >.

ADU, B. et al. Antibody levels against GLURP R2, MSP1 block 2 hybrid and AS202.11 and the risk of malaria in children living in hyperendemic (Burkina Faso) and hypo-endemic (Ghana) areas. **Malar J**, v. 15, p. 123, Feb 2016. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26921176> >.

AGUILAR, R. et al. Antibody responses to α -Gal in African children vary with age and site and are associated with malaria protection. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 9999, 07 2018. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29968771> >.

AK, M. et al. Humoral immune responses against *Plasmodium vivax* MSP1 in humans living in a malaria endemic area in Flores, Indonesia. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 29, n. 4, p. 685-91, Dec 1998. ISSN 0125-1562. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10772546> >.

ALEXANDRE, M. A. et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis**, v. 16, n. 10, p. 1611-4, Oct 2010. ISSN 1080-6059. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20875292> >.

ALMEIDA, A. C. G. et al. High proportions of asymptomatic and submicroscopic *Plasmodium vivax* infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. **Parasit Vectors**, v. 11, p.194, 2018

AMARAL, L. C. et al. Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections. **Malar J**, v. 18, n. 1, p.154, Apr 2019.

AMINO, R. et al (a). Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nat Med**, v. 12, n. 2, p. 220-4, Feb 2006. ISSN 1078-8956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16429144> >.

AMINO, R et al (b). Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. **C R Biol**, v. 329, n. 11, p. 858-62, Nov 2006. ISSN 1631-0691. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17067928> >.

ANN, L et al. Development of B cell memory in malaria. **Front Immunol**, v.10, n. 559, Apr 2019.

ANSTEY, N. M. et al. Plasmodium vivax: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. **Adv Parasitol**, v. 80, p. 151-201, 2012. ISSN 2163-6079. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199488> >.

ANSTEY, N. M. et al. The pathophysiology of vivax malaria. **Trends Parasitol**, v. 25, n. 5, p. 220-7, May 2009. ISSN 1471-5007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349210> >.

ANTONELLI, L. R. et al. The immunology of Plasmodium vivax malaria. **Immunol Rev**, v. 293, n. 1, p. 163-189, 01 2020. ISSN 1600-065X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31642531> >.

ANTONELLI, L. R. et al. The CD14+CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute Plasmodium vivax malaria. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 9, p. e1004393, Sep 2014. ISSN 1553-7374. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25233271> >.

ARAMA, C. et al. Genetic Resistance to Malaria Is Associated With Greater Enhancement of Immunoglobulin (Ig)M Than IgG Responses to a Broad Array of Plasmodium falciparum Antigens. **Open Forum Infect Dis**, v. 2, n. 3, p. ofv118, Sep 2015. ISSN 2328-8957. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26361633> >.

ARMISTEAD, J. S.; ADAMS, J. H. Advancing Research Models and Technologies to Overcome Biological Barriers to Plasmodium vivax Control. **Trends Parasitol**, v. 34, n. 2, p. 114-126, 02 2018. ISSN 1471-5007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29153587> >.

ARORA, G. et al. NK cells inhibit. **Elife**, v. 7, 06 2018. ISSN 2050-084X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29943728> >.

ARÉVALO-HERRERA, M. et al. Antibody Profiling in Naïve and Semi-immune Individuals Experimentally Challenged with Plasmodium vivax Sporozoites. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 3, p. e0004563, Mar 2016. ISSN 1935-2735. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27014875> >.

BACHMANN MF, Kalinke U, Althage A, Freer G, Burkhardt C, Roost H, et al. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. **Science**, v.276, p:2024–2027, 1997. doi: 10.1126/science.276.5321.2024.

BAIRD, J. K.; SCHWARTZ, E.; HOFFMAN, S. L. Prevention and treatment of vivax malaria. **Curr Infect Dis Rep**, v. 9, n. 1, p. 39-46, Jan 2007. ISSN 1523-3847. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17254503> >.

BARATA, R. B. Technologic organization of malaria control in São Paulo, Brazil, 1930-1990. **Rev Panam Salud Publica**, v. 3, n. 2, p. 102-10, Feb 1998. ISSN 1020-4989. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9542447> >.

BARATA, R. C. [Malaria in Brazil: trends in the last ten years]. **Cad Saude Publica**, v. 11, n. 1, p. 128-36, 1995 Jan-Mar 1995. ISSN 0102-311X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14528364> >.

BARBEDO, M. B. et al. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of Plasmodium vivax.

Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 102, n. 3, p. 335-9, Jun 2007. ISSN 0074-0276. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568939> >.

BARBER, B. E. et al. Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction and disease severity in vivax malaria. **Plos Pathogen**, v.11, n.1, p. e1004558. Jan 2015.

BASSAT, Q. et al. **(a)** Combating poor-quality anti-malarial medicines: a call to action. **Malar J**, v. 15, p. 302, 06 2016. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27251199> >.

BASSAT, Q. et al. **(b)** Key Knowledge Gaps for Plasmodium vivax Control and Elimination. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 62-71, Dec 2016. ISSN 1476-1645. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27430544> >.

BASTOS, M. S. et al. Antigenic polymorphism and naturally acquired antibodies to Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 in rural Amazonians. **Clin Vaccine Immunol**, v. 14, n. 10, p. 1249-59, Oct 2007. ISSN 1556-6811. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699838> >.

BATCHELOR, J. D.; ZAHM, J. A.; TOLIA, N. H. Dimerization of Plasmodium vivax DBP is induced upon receptor binding and drives recognition of DARC. **Nat Struct Mol Biol**, v. 18, n. 8, p. 908-14, Jul 2011. ISSN 1545-9985. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21743458> >.

BATTLE, K. E. et al. The global public health significance of Plasmodium vivax. **Adv Parasitol**, v. 80, p. 1-111, 2012. ISSN 2163-6079. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199486> >.

BEESON, J. G. et al. Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. **FEMS Microbiol Rev**, v. 40, n. 3, p. 343-72, May 2016. ISSN 1574-6976. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26833236> >.

BENNION, B. & DAGGETT, V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 100, 5142-5147. May 2003.

BERRY, A. A. 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. **Malar J**, v. 18, n. 1, p. 13, Jan 2019. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30658710> >.

BEUTLER, E.; DUPARC, S.; GROUP, G. P. D. W. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and antimalarial drug development. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 4, p. 779-89, Oct 2007. ISSN 0002-9637. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17978087> >.

BILLKER, O. et al. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 289-92, Mar 1998. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521324> >.

BITOH, T. et al. Risk analysis of the re-emergence of Plasmodium vivax malaria in Japan using a stochastic transmission model. **Environ Health Prev Med**, v. 16, n. 3, p. 171-7, May 2011. ISSN 1347-4715. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21431796> >.

BITTENCOURT, N. C. et al. Genetic sequence characterization and naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* Rhoptry Neck Protein 2 (PvRON2). **Malar J**, v. 17, n. 1, p. 401, Oct 2018. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30382855> >.

BLACKMAN, M. J. et al. 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**, v. 172, n. 1, p. 379-82, Jul 1990. ISSN 0022-1007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1694225> >.

BOES, M. et al. A Critical Role of Natural Immunoglobulin M in Immediate Defense Against Systemic Bacterial Infection. **J Exp Med**, v. 188, n.12, p. 2381–2386. 1988.

BOHANNON, C. et al. Long-lived antigen-induced IgM plasma cells demonstrate somatic mutations and contribute to long-term protection. **Nat Commun**, v. 7, p. 11826, 06 2016. ISSN 2041-1723. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27270306> >.

BOONYARATANAKORNKIT, J.; TAYLOR, J. J. Immunoglobulin M, more than just an early responder to malaria. **Immunol Cell Biol**, v. 97, n. 9, p. 771-773, 10 2019. ISSN 1440-1711. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31603585> >.

BORGES DA SILVA, H. et al. CD28 deficiency leads to accumulation of germinal-center independent IgM+ experienced B cells and to production of protective IgM during experimental malaria. **PLoS One**, v. 13, n. 8, p. e0202522, 2018. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30148845> >.

BOUHAROUN-TAYOUN, H. et al. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. **J Exp Med**, v. 172, n. 6, p. 1633-41, Dec 1990. ISSN 0022-1007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2258697> >.

BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, n. 2, p. 377-410, Apr 2011. ISSN 1098-6618. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21482730> >.

BOYLE, M. J. et al. IgM in human immunity to. **Sci Adv**, v. 5, n. 9, p. eaax4489, Sep 2019. ISSN 2375-2548. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31579826> >.

BOYLE, M. J. et al. Human antibodies fix complement to inhibit *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 580-90, Mar 2015. ISSN 1097-4180. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25786180> >.

BOYLE, M. J. et al. Interactions with heparin-like molecules during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. **Blood**, v. 115, n. 22, p. 4559-68, Jun 2010. ISSN 1528-0020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20220119> >.

BRANDÃO Jr., A.; SOUZA Jr., C. Deforestation in land reform settlements in the Amazon. **State of the Amazon**, Belém, v.7, p: 1-4, 2006.

BRASIL, P. 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**, v. 5, n. 10, p. e1038-e1046, 10 2017. ISSN 2214-109X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28867401> >.

BROWDER, J. O. et al. Revisiting theories of frontier expansion in the Brazilian Amazon: A survey of the colonist farming population in Rondonia's post-frontier, 1992-2002. *World Development*, v. 36, n.8, p.1469-1492, Aug 2008

BULL, P. C. et al. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat Med*, v. 4, n. 3, p. 358-60, Mar 1998. ISSN 1078-8956. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9500614> >.

BUSCH, M. P. et al. Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection. *J Infect Dis*, v. 198, n. 7, p. 984-93, Oct 2008. ISSN 0022-1899. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18729783> >.

CAMARGO, L. M. et al. The epidemiology of malaria in Rondonia (Western Amazon region, Brazil): study of a riverine population. *Acta Trop*, v. 72, n. 1, p. 1-11, Jan 1999. ISSN 0001-706X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9924956> >.

CARROLL, M. C. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol*, v. 5, n. 10, p. 981-6, Oct 2004. ISSN 1529-2908. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15454921> >.

CASSIANO, G. C. et al. Polymorphisms in B Cell Co-Stimulatory Genes Are Associated with IgG Antibody Responses against Blood-Stage Proteins of *Plasmodium vivax*. *Plos One*, v 11, n. 2, p. e0149581, Feb 2016.

CAVASINI, C. E. et al. Frequencies of ABO, MNSs, and Duffy phenotypes among blood donors and malaria patients from four Brazilian Amazon areas. *Hum Biol*, v. 78, n. 2, p. 215-9, Apr 2006. ISSN 0018-7143. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17036927> >.

CERAVOLO, I. P. et al. Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. *Clin Exp Immunol*, v. 156, n. 3, p. 502-10, Jun 2009. ISSN 1365-2249. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19438604> >.

CERAVOLO, I. P. et al. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scand J Immunol*, v. 67, n. 3, p. 270-8, Mar 2008. ISSN 1365-3083. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18226014> >.

CERÁVOLO, I. P. et al. Anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*, v. 72, n. 6, p. 675-81, Jun 2005. ISSN 0002-9637. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15964949> >.

CHEN, E. et al. Broadly neutralizing epitopes in the *Plasmodium vivax* vaccine candidate Duffy Binding Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 113, n. 22, p. 6277-82, May 2016. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27194724> >.

CHEN, E. et al. Structural analysis of the synthetic Duffy Binding Protein (DBP) antigen DEKnull relevant for *Plasmodium vivax* malaria vaccine design. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 9, n. 3, p. e0003644, Mar 2015. ISSN 1935-2735. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25793371> >.

CHEN, J. H. et al. Immunoproteomics profiling of blood stage *Plasmodium vivax* infection by high-throughput screening assays. *J Proteome Res*, v. 9, n. 12, p. 6479-89, Dec 2010. ISSN 1535-3907. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20949973> >.

CHENG, Q. et al. Systematic review of sub-microscopic *P. vivax* infections: prevalence and determining factors. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 9, n. 1, p. e3413, Jan 2015.

CHIMMA, P. et al. A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Pathog*, v. 5, n. 10, p. e1000631, Oct 2009. ISSN 1553-7374. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19851453> >.

CHITNIS, C. E. et al. The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J Exp Med*, v. 184, n. 4, p. 1531-6, Oct 1996. ISSN 0022-1007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8879225> >.

CHITNIS, C. E.; MILLER, L. H. Identification of the erythrocyte binding domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med*, v. 180, n. 2, p. 497-506, Aug 1994. ISSN 0022-1007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8046329> >.

CHOOTONG, P. et al. Mapping epitopes of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. *Infect Immun*, v. 78, n. 3, p. 1089-95, Mar 2010. ISSN 1098-5522. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20008533> >.

CHOOTONG, P. et al Characterization of inhibitory anti-Duffy binding protein II immunity: approach to *Plasmodium vivax* vaccine development in Thailand. *PLoS One*, v. 7, n. 4, p. e35769, 2012. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558221> >.

CHUQUIYAURI, R. et al. Genome-Scale Protein Microarray Comparison of Human Antibody Responses in *Plasmodium vivax* Relapse and Reinfection. *Am J Trop Med Hyg*, v. 93, n. 4, p. 801-9, Oct 2015. ISSN 1476-1645. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26149860> >.

COELHO, Z. B. A. et al. Preliminary assessment of anti- α -Gal IgG and IgM levels in patients with patent *Plasmodium vivax* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 114, p. e190145, 2019. ISSN 1678-8060. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31291383> >.

COHEN, S.; BUTCHER, G. A.; CRANDALL, R. B. Action of malarial antibody in vitro. *Nature*, v. 223, n. 5204, p. 368-71, Jul 1969. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4980851> >.

COHEN, S.; MCGREGOR, I. A.; CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*, v. 192, p. 733-7, Nov 1961. ISSN 0028-0836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13880318> >.

COLE-TOBIAN, J.; KING, C. L. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. *Mol Biochem Parasitol*, v. 127, n. 2, p. 121-32, Apr 2003. ISSN 0166-6851. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672521> >.

COLE-TOBIAN, J. L. et al. Age-acquired immunity to a *Plasmodium vivax* invasion ligand, the duffy binding protein. *J Infect Dis*, v. 186, n. 4, p. 531-9, Aug 2002. ISSN 0022-1899. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12195381> >.

COLE-TOBIAN, J. L. et al. Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous plasmodium vivax strains in Papua New Guinean children. *Infect Immun*, v. 77, n. 9, p. 4009-17, Sep 2009. ISSN 1098-5522. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19564376> >.

COOPER, N. R. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol*, v. 37, p. 151-216, 1985. ISSN 0065-2776. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3890478> >.

COSTA, D. C. et al. Plasmodium simium/Plasmodium vivax infections in southern brown howler monkeys from the Atlantic Forest. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 5, p. 641-53, Aug 2014. ISSN 1678-8060. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25099335> >.

COUPER, K. N. et al. Parasite-specific IgM plays a significant role in the protective immune response to asexual erythrocytic stage Plasmodium chabaudi AS infection. *Parasite Immunol*, v. 27, n. 5, p. 171-80, May 2005. ISSN 0141-9838. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987340> >.

COWMAN, A. F.; BERRY, D.; BAUM, J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J Cell Biol*, v. 198, n. 6, p. 961-71, Sep 2012. ISSN 1540-8140. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986493> >.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, v. 124, n. 4, p. 755-66, Feb 2006. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497586> >.

COWMAN, A. F. et al. Malaria: Biology and Disease. *Cell*, v. 167, n. 3, p. 610-624, Oct 2016. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27768886> >.

COWMAN, A. F. et al. The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host Microbe*, v. 22, n. 2, p. 232-245, Aug 2017. ISSN 1934-6069. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28799908> >.

COX, F. E. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev*, v. 15, n. 4, p. 595-612, Oct 2002. ISSN 0893-8512. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12364371> >.

CUNHA, M. G.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the Plasmodium vivax vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine*, v. 20, n. 3-4, p. 385-96, Nov 2001. ISSN 0264-410X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11672901> >.

CUTTS, J. C. et al. Immunological markers of Plasmodium vivax exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med*, v. 12, p. 150, Sep 2014. ISSN 1741-7015. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25199532> >.

DA SILVA, R.; HOCHMAN, G. [A method called Pinotti: medicated salt, malaria, and international health (1952-1960)]. *Hist Cienc Saude Manguinhos*, v. 18, n. 2, p. 519-43, Jun 2011. ISSN 1678-4758. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779697> >.

DALRYMPLE, U.; MAPPIN, B.; GETHING, P. W. Malaria mapping: understanding the global endemicity of falciparum and vivax malaria. *BMC Med*, v. 13, p. 140, Jun 2015. ISSN 1741-7015. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26071312> >.

DE ALVARENGA, D. A. et al. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. *Malar J*, v. 14, p. 81, Feb 2015. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25889933> >.

DE CASTRO, M. C. et al. Malaria risk on the Amazon frontier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n. 7, p. 2452-7, Feb 2006. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461902> >.

DE SOUSA, T. N. et al. The Duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: lessons from the Brazilian Amazon. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 5, p. 608-17, Aug 2014. ISSN 1678-8060. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25185002> >.

DIAMOND, M. S. et al. A critical role for induced IgM in protection against West Nile Virus infection. **J exp Med**, v. 198, n. 12, p. 1853-62, Dec 2003.

DOBBS, K. R.; DENT, A. E. *Plasmodium* malaria and antimalarial antibodies in the first year of life. *Parasitology*, v. 143, n. 2, p. 129-38, Feb 2016. ISSN 1469-8161. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26743626> >.

DODOO, D. et al. Cohort study of the association of antibody levels to AMA1, MSP119, MSP3 and GLURP with protection from clinical malaria in Ghanaian children. *Malar J*, v. 7, p. 142, Jul 2008. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18664257> >.

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev*, v. 22, n. 1, p. 13-36, Table of Contents, Jan 2009. ISSN 1098-6618. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136431> >.

EISEN, H. N. Affinity enhancement of antibodies: how low-affinity antibodies produced early in immune responses are followed by high-affinity antibodies later and in memory B-cell responses. Review. *Cancer Immunol Res*, v. 2, n.5, p.381-92, May 2014.

FANG, X. D. et al. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol Biochem Parasitol*, v. 44, n. 1, p. 125-32, Jan 1991. ISSN 0166-6851. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1849231> >.

FARIAS, E. et al. A simple, ex vivo phagocytosis assay of *Plasmodium vivax* merozoites by flow cytometry. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 114, p. e190158, 2019. ISSN 1678-8060. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31596312> >.

FERNANDEZ-BECERRA, C. et al. 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*, v. 9, p. 29, Jan 2010. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20092651> >.

FERREIRA MU, Kimura EAS, de Souza JM, Katzin AM. The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients. *Am J Trop Med Hyg*, v.55, p:315–323, 1996.

FIGUEIREDO, M. M. et al. T follicular helper cells regulate the activation of B lymphocytes and antibody production during *Plasmodium vivax* infection. *PLoS Pathog*, v. 13, n. 7, p. e1006484, Jul 2017. ISSN 1553-7374. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28700710> >.

FOWKES, F. J. et al. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*, v. 7, n. 1, p. e1000218, Jan 2010. ISSN 1549-1676. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20098724> >.

FRANÇA, C. T. et al. *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins Are Key Targets of Naturally Acquired Immunity in Young Papua New Guinean Children. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 10, n. 9, p. e0005014, Sep 2016. ISSN 1935-2735. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27677183> >.

FRANÇA, C. T. et al. An Antibody Screen of a *Plasmodium vivax* Antigen Library Identifies Novel Merozoite Proteins Associated with Clinical Protection. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 10, n. 5, p. e0004639, 05 2016. ISSN 1935-2735. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27182597> >.

FRASER, T. et al. Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Infect Immun*, v. 65, n. 7, p. 2772-7, Jul 1997. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9199449> >.

FREEMAN, R. R.; HOLDER, A. A. Surface antigens of malaria merozoites. A high molecular weight precursor is processed to an 83,000 mol wt form expressed on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. *J Exp Med*, v. 158, n. 5, p. 1647-53, Nov 1983. ISSN 0022-1007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6355363> >.

GATTO D, BRINK R. The germinal center reaction. *J Allergy Clin Immunol*, v. 126, p:898–909, 2010. doi: 10.1016/j.jaci.2010.09.007.

GALINSKI, M. R. et al. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. *Cell*, v. 69, n. 7, p. 1213-26, Jun 1992. ISSN 0092-8674. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1617731> >.

GENTON, B. et al. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Med*, v. 5, n. 6, p. e127, Jun 2008. ISSN 1549-1676. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18563961> >.

GEORGE, M. T. et al. Identification of an Immunogenic Broadly Inhibitory Surface Epitope of the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein Ligand Domain. *mSphere*. v.4, n.3, 2019.

GEROLD, P. et al. Structural analysis of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the merozoite surface proteins-1 and -2 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 75, n. 2, p. 131-43, Jan 1996. ISSN 0166-6851. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8992312> >.

GETHING, P. W. et al. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n. 9, p. e1814, 2012. ISSN 1935-2735. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22970336> >.

GLUSHAKOVA, S. et al. Membrane transformation during malaria parasite release from human red blood cells. *Curr Biol*, v. 15, n. 18, p. 1645-50, Sep 2005. ISSN 0960-9822. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169486> >.

GOLDBLATT D, Vaz AR, Miller E. Antibody avidity as a surrogate marker of successful priming by Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines following infant immunization. *J Infect Dis*, v. 177, p.1112–1115, 1998. doi: 10.1086/517407

GRIFFING, S. M. et al. A historical perspective on malaria control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 6, p. 701-18, Sep 2015. ISSN 1678-8060. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26517649> >.

GRIMBERG, B. T. et al. Plasmodium vivax invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *PLoS Med*, v. 4, n. 12, p. e337, Dec 2007. ISSN 1549-1676. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18092885> >.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, Dec 2010. ISSN 1740-1534. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079655> >.

GYAN, B. et al. Human monocytes cultured with and without interferon-gamma inhibit Plasmodium falciparum parasite growth in vitro via secretion of reactive nitrogen intermediates. *Parasite Immunol*, v. 16, n. 7, p. 371-5, Jul 1994. ISSN 0141-9838. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7970876> >.

HART, G. T. et al. Adaptive NK cells in people exposed to. *J Exp Med*, v. 216, n. 6, p. 1280-1290, 06 2019. ISSN 1540-9538. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30979790> >.

HARTE, P. G. et al. Specific monoclonal IgM is a potent adjuvant in murine malaria vaccination. *Nature*, v.302, n.5905, p.256-8. 1983.

HEALER, J. et al. Neutralising antibodies block the function of Rh5/Ripr/CyRPA complex during invasion of Plasmodium falciparum into human erythrocytes. *Cell Microbiol*, v. 21, n. 7, p. e13030, 07 2019. ISSN 1462-5822. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30965383> >.

HEDMAN K, Lappalainen M, Soderlund M, Hedman L. Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. *Rev Med Microbiol*, v. 4, p:123–129, 1993. doi: 10.1097/00013542-199307000-00001.

HILL, D. L. et al. Opsonising antibodies to P. falciparum merozoites associated with immunity to clinical malaria. *PLoS One*, v. 8, n. 9, p. e74627, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24040299> >.

HILL, D. L.; SCHOFIELD, L.; WILSON, D. W. IgG opsonization of merozoites: multiple immune mechanisms for malaria vaccine development. *Int J Parasitol*, v. 47, n. 10-11, p. 585-595, 09 2017. ISSN 1879-0135. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28668325> >.

HOLDER, A. A. et al. A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 87 Suppl 3, p. 37-42, 1992. ISSN 0074-0276. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1343716> >.

IBISON F, Olotu A, Muema DM, Mwacharo J, Ohuma E, Kimani D, et al. Lack of avidity maturation of merozoite antigen-specific antibodies with increasing exposure to Plasmodium falciparum amongst children and adults exposed to endemic malaria in Kenya. *PLoS ONE*, v. 7 p: e52939, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0052939.

JOOS, C. et al. Clinical protection from falciparum malaria correlates with neutrophil respiratory bursts induced by merozoites opsonized with human serum antibodies. *PLoS One*, v. 5, n. 3, p. e9871, Mar 2010. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20360847> >.

JULIEN, J. P.; WARDEMAN, H. Antibodies against *Plasmodium falciparum* malaria at the molecular level. *Nat Rev Immunol*, v. 19, n. 12, p. 761-775, 12 2019. ISSN 1474-1741. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31462718> >.

KANA, I. H. et al. Naturally Acquired Antibodies Target the Glutamate-Rich Protein on Intact Merozoites and Predict Protection Against Febrile Malaria. *J Infect Dis*, v. 215, n. 4, p. 623-630, 02 2017. ISSN 1537-6613. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28329101> >.

KANO, F. S. et al. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Health*, v. 17, n. 8, p. 989-1000, Aug 2012. ISSN 1365-3156. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22643072> >.

KANO, F.S. et al. The Presence, Persistence and Functional Properties of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 10, n. 12, p. e0005177, Dec 2016. ISSN 1935-2735. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27959918> >.

KAPELSKI, S. et al. Assessment of the neutrophilic antibody-dependent respiratory burst (ADRB) response to *Plasmodium falciparum*. *J Leukoc Biol*, v. 96, n. 6, p. 1131-42, Dec 2014. ISSN 1938-3673. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25118179> >.

KASLOW, D. C.; KUMAR, S. Expression and immunogenicity of the C-terminus of a major blood-stage surface protein of *Plasmodium vivax*, Pv200(19), secreted from *Saccharomyces cerevisiae*. *Immunol Lett*, v. 51, n. 3, p. 187-9, Jul 1996. ISSN 0165-2478. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8832290> >.

KENNEDY, A. T. et al. Recruitment of Factor H as a Novel Complement Evasion Strategy for Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Infection. *J Immunol*, v. 196, n. 3, p. 1239-48, Feb 2016. ISSN 1550-6606. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26700768> >.

KIM, H. C. et al. Malaria in the Republic of Korea, 1993-2007. Variables related to re-emergence and persistence of *Plasmodium vivax* among Korean populations and U.S. forces in Korea. *Mil Med*, v. 174, n. 7, p. 762-9, Jul 2009. ISSN 0026-4075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19685850> >.

KING, C. L. et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, n. 24, p. 8363-8, Jun 2008. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18523022> >.

KRISHNAMURTY, A. T. et al. Somatically Hypermutated *Plasmodium*-Specific IgM(+) Memory B Cells Are Rapid, Plastic, Early Responders upon Malaria Rechallenge. *Immunity*, v. 45, n. 2, p. 402-14, 08 2016. ISSN 1097-4180. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27473412> >.

KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 79, n. 1, p. 1-11, 1985. ISSN 0035-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3922096> >.

KUMARATILAKE, L. M.; FERRANTE, A. IL-4 inhibits macrophage-mediated killing of *Plasmodium falciparum* in vitro. A possible parasite-immune evasion mechanism. *J Immunol*, v. 149, n. 1, p. 194-9, Jul 1992. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1607652> >.

LACERDA, M. V. et al. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: to what extent does this parasite kill? *Clin Infect Dis*, v. 55, n. 8, p. e67-74, Oct 2012. ISSN 1537-6591. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22772803> >.

LADEIA-ANDRADE, S. et al. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, v. 80, n. 3, p. 452-9, Mar 2009. ISSN 1476-1645. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270298> >.

LADEIA-ANDRADE, S. et al. Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP)-1(19) and cumulative exposure to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 8, p. 943-51, Dec 2007. ISSN 0074-0276. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18209933> >.

LAVERAN A: Un nouveau parasite trouvé dans le sang de malades atteints de fièvre palustre. Origine parasitaire des accidents de l'impaludisme. *Bull Mém Soc Méd Hôpitaux Paris*, v. 17, p: 158-164, 1881.

LEORATTI FM, Durlacher RR, Lacerda MV, Alecrim MG, Ferreira AW, Sanchez MC, et al. Pattern of humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Malar J*, v.7 p:186, 2008. doi: 10.1186/1475-2875-7-186.

LEVETT, P. N. et al. Use of immunoglobulin G avidity assays for differentiation of primary from previous infections with West Nile virus. *J Clin Microbiol*, v. 43, n. 12, p. 5873-5, Dec 2005. ISSN 0095-1137. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16333069> >.

LONGLEY, R. J.; SATTABONGKOT, J.; MUELLER, I. Insights into the naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* malaria. *Parasitology*, v. 143, n. 2, p. 154-70, Feb 2016. ISSN 1469-8161. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26864134> >.

LÓPEZ, C. et al. What Is Known about the Immune Response Induced by. *Front Immunol*, v. 8, p. 126, 2017. ISSN 1664-3224. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28243235> >.

LY A, Liao Y, Pietrzak H, Shi W, Kallies A, Hansen DS. Transcription Factor T-bet in B Cells Modulates Germinal Center Polarization and Antibody Affinity Maturation in Response to Malaria. v. 29 (8), p. 2257-2269. Nov 2019. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.087>.

MAESTRE, A. et al. Acquired antibody responses against *Plasmodium vivax* infection vary with host genotype for duffy antigen receptor for chemokines (DARC). *PLoS One*, v. 5, n. 7, p. e11437, Jul 2010. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664684> >.

MALLERET, B. et al. Plasmodium vivax: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. *Blood*, v. 125, n. 8, p. 1314-24, Feb 2015. ISSN 1528-0020. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25414440> >.

MARQUES, A. C.; PINHEIRO, E. A.; DE SOUZA, A. G. [Dispersion of cases of malaria in Brazil]. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, v. 38, p. 51-75, 1986. ISSN 0034-7256. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3267859> >.

MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*, v. 28, n. 1-2, p. 51-60, 2006 Jan-Feb 2006. ISSN 0141-9838. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16438676> >.

MAYNARD JA, Maassen CB, Leppla SH, Brasky K, Patterson JL, Iverson BL, et al. Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nat Biotechnol*, v.20, p:597–601, 2002. doi: 10.1038/nbt0602-597.

MBENGUE, B. et al. Analysis of antibody responses to selected Plasmodium falciparum merozoite surface antigens in mild and cerebral malaria and associations with clinical outcomes. *Clin Exp Immunol*, v. 196, n. 1, p. 86-96, 04 2019. ISSN 1365-2249. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30580455> >.

MCQUEEN, P. G.; MCKENZIE, F. E. Age-structured red blood cell susceptibility and the dynamics of malaria infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 24, p. 9161-6, Jun 2004. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15178766> >.

MEDICA, D. L.; SINNIS, P. Quantitative dynamics of Plasmodium yoelii sporozoite transmission by infected anopheline mosquitoes. *Infect Immun*, v. 73, n. 7, p. 4363-9, Jul 2005. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972531> >.

MEHRIZI, A. A. et al. 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*, v. 112, n. 1, p. 1-7, Oct 2009. ISSN 1873-6254. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19481997> >.

MICHON, P.; FRASER, T.; ADAMS, J. H. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the Plasmodium vivax Duffy binding protein. *Infect Immun*, v. 68, n. 6, p. 3164-71, Jun 2000. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816459> >.

MILLER, L. H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nat Med*, v. 19, n. 2, p. 156-67, Feb 2013. ISSN 1546-170X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23389616> >.

MILLER, L. H. et al. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med*, v. 295, n. 6, p. 302-4, Aug 1976. ISSN 0028-4793. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/778616> >.

MIN, H. M. K. et al. Immunogenicity of the Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 paralog in the induction of naturally acquired antibody and memory B cell responses. *Malar J*, v. 16, n. 1, p. 354, 08 2017. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28854974> >.

MORAIS, C. G. et al. 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*, v.

95, n. 6, p. 420-6, Apr 2005. ISSN 0932-0113. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15759156> >.

MORENO-PÉREZ DA, Ruíz JA, Patarroyo MA. Reticulocytes: *Plasmodium vivax* target cells. *Biol Cell. Review*, v.105(6), p:251-60, Jun 2013.

MORGAN, W. D. et al. Solution structure of an EGF module pair from the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. *J Mol Biol*, v. 289, n. 1, p. 113-22, May 1999. ISSN 0022-2836. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10339410> >.

MOURÃO, L. C. et al. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* blood-stage vaccine candidates (PvMSP-1₁₉ and PvMSP-3_{α359-798} and their relationship with hematological features in malaria patients from the Brazilian Amazon. *Microbes Infect*, v. 14, n. 9, p. 730-9, Aug 2012. ISSN 1769-714X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22445906> >.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*, v. 9, n. 9, p. 555-66, Sep 2009. ISSN 1474-4457. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19695492> >.

MUELLER, I. et al. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. *Adv Parasitol*, v. 81, p. 77-131, 2013. ISSN 2163-6079. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384622> >.

MURUNGI, L. M. et al. Targets and Mechanisms Associated with Protection from Severe *Plasmodium falciparum* Malaria in Kenyan Children. *Infect Immun*, v. 84, n. 4, p. 950-963, Apr 2016. ISSN 1098-5522. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26787721> >.

MÉNARD, D. et al. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 13, p. 5967-71, Mar 2010. ISSN 1091-6490. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20231434> >.

NICOLETE, V. C. et al. Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein and Clinical Immunity to Malaria in Rural Amazonians. *J Infect Dis*, v. 214, n. 10, p. 1539-1546, Nov 2016. ISSN 1537-6613. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27578850> >.

NIJHOUT, M. M.; CARTER, R. Gamete development in malaria parasites: bicarbonate-dependent stimulation by pH in vitro. *Parasitology*, v. 76, n. 1, p. 39-53, Feb 1978. ISSN 0031-1820. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23512> >.

NOGUEIRA, P. A. et al. 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*, v. 74, n. 5, p. 2726-33, May 2006. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622209> >.

NOULIN, F. et al. 1912-2012: a century of research on *Plasmodium vivax* in vitro culture. *Trends Parasitol*, v. 29, n. 6, p. 286-94, Jun 2013. ISSN 1471-5007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23623759> >.

NTUMNGIA, F. B.; KING, C. L.; ADAMS, J. H. Finding the sweet spots of inhibition: understanding the targets of a functional antibody against *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Int J Parasitol*, v. 42, n. 12, p. 1055-62, Nov 2012. ISSN 1879-0135. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23068913> >.

NTUMNGIA, F. B. et al. An engineered vaccine of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein enhances induction of broadly neutralizing antibodies. *Sci Rep*, v. 7, n. 1, p. 13779, Oct 2017. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29062081> >.

NTUMNGIA, F. B. et al. Conserved and variant epitopes of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein as targets of inhibitory monoclonal antibodies. *Infect Immun*, v. 80, n. 3, p. 1203-8, Mar 2012. ISSN 1098-5522. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22215740> >.

NTUMNGIA, F. B. et al. A Novel Erythrocyte Binding Protein of *Plasmodium vivax* Suggests an Alternate Invasion Pathway into Duffy-Positive Reticulocytes. *MBio*, v. 7, n. 4, Aug 2016. ISSN 2150-7511. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27555313> >.

NÓBREGA DE SOUSA, T.; CARVALHO, L. H.; ALVES DE BRITO, C. F. Worldwide genetic variability of the Duffy binding protein: insights into *Plasmodium vivax* vaccine development. *PLoS One*, v. 6, n. 8, p. e22944, 2011. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21829672> >.

OBALDIA III. N. et al. Bone marrow is a major parasite reservoir in *Plasmodium vivax* infections. *American Society of Microbiology*, 10.1128/mBio.00625-18, 2018.

O'DONNELL, R. A. et al. Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J Exp Med*, v. 193, n. 12, p. 1403-12, Jun 2001. ISSN 0022-1007. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11413195> >.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*, v. 9, p. 115, Apr 2010. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20433744> >.

OSIER, F. H. et al. Opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. *BMC Med*, v. 12, p. 108, Jul 2014. ISSN 1741-7015. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24980799> >.

OYONG, D. A. et al. Induction and Kinetics of Complement-Fixing Antibodies Against *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 3 α and Relationship With Immunoglobulin G Subclasses and Immunoglobulin M. *J Infect Dis*, v. 220, n. 12, p. 1950-1961, 11 2019. ISSN 1537-6613. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31419296> >.

PAPILLION, A. M. et al. Early derivation of IgM memory cells and bone marrow plasmablasts. *Plos One*, v. 12, n.6, Jun 2017.

PARK, J. W. et al. Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 8, n. 1, p. 14-20, Jan 2001. ISSN 1071-412X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11139190> >.

PATARROYO, M. A.; ARÉVALO-PINZÓN, G.; MORENO-PÉREZ, D. A. From a basic to a functional approach for developing a blood stage vaccine against. *Expert Rev Vaccines*, v. 19, n. 2, p. 195-207, Feb 2020. ISSN 1744-8395. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32077349> >.

PATARROYO, M. A.; CALDERÓN, D.; MORENO-PÉREZ, D. A. Vaccines against *Plasmodium vivax*: a research challenge. *Expert Rev Vaccines*, v. 11, n. 10, p. 1249-60, Oct 2012. ISSN 1744-8395. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23176656> >.

PATGAONKAR, M. et al. Vivax infection alters peripheral B-cell profile and induces persistent serum IgM. *Parasite Immunol*, v. 40, n. 10, p. e12580, Oct 2018. ISSN 1365-3024. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30102786> >.

PINOTTI, M. et al. [Field tests of chloroquin-table salt mixture]. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, v. 7, n. 1, p. 5-23, Jan 1955. ISSN 0034-7256. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13290132> >.

PIRES, C. V. et al. Blood-stage *Plasmodium vivax* antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. *PLoS One*, v. 13, n. 11, p. e0207244, 2018. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30419071> >.

PITABUT, N. et al. IgG antibody profile to c-terminal region of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 in Thai individuals exposed to malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 38, n. 1, p. 1-7, Jan 2007. ISSN 0125-1562. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17539238> >.

PLEASS, R. J. et al. Immunoglobulin M: Restrainer of Inflammation and Mediator of Immune Evasion by *Plasmodium falciparum* Malaria. Review. *Trends Parasitol*, v. 32, n.2, p. 108-119, Feb 2016.

PRICE, R. N.; DOUGLAS, N. M.; ANSTEY, N. M. New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. *Curr Opin Infect Dis*, v. 22, n. 5, p. 430-5, Oct 2009. ISSN 1473-6527. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19571748> >.

PRICE, R. N. et al. Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, v. 14, n. 10, p. 982-91, Oct 2014. ISSN 1474-4457. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25213732> >.

RANJAN, A.; CHITNIS, C. E. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, n. 24, p. 14067-72, Nov 1999. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10570199> >.

RECHT, J. et al. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J*, v. 16, n. 1, p. 273, Jul 2017. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28676055> >.

REDDY SB, Anders RF, Beeson JG, Färnert A, Kironde F, Berenzon SK, et al. High affinity antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from malaria. *PLoS ONE*, v. 7, p:e32242, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0032242.

REITER, P. From Shakespeare to Defoe: malaria in England in the Little Ice Age. *Emerg Infect Dis*, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2000 Jan-Feb 2000. ISSN 1080-6040. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10653562> >.

REYES, S. [Malarial infections caused by *Plasmodium falciparum* resistant to chloroquine treatment. The situation in Brazil (1960-1981)]. *Rev Bras Malariol Doencas Trop*, v. 33, p. 109-30, 1981. ISSN 0034-7256. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6760261> >.

RICCIO, E. K. et al. Cellular and humoral immune responses against the *Plasmodium vivax* MSP-1₁₉ malaria vaccine candidate in individuals living in an endemic area in north-eastern

Amazon region of Brazil. *Malar J*, v. 12, p. 326, Sep 2013. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24041406> >.

RICHARDS, J. S. et al. Association between naturally acquired antibodies to erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and protection from malaria and high-density parasitemia. *Clin Infect Dis*, v. 51, n. 8, p. e50-60, Oct 2010. ISSN 1537-6591. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843207> >.

RODRIGUES, M. H. et al. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. *Malar J*, v. 2, n. 1, p. 39, Nov 2003. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14617378> >.

ROLLER, N. R.; DESSER, S. S. The effect of temperature, age and density of gametocytes, and changes in gas composition on exflagellation of *Leucocytozoon simondi*. *Can J Zool*, v. 51, n. 6, p. 577-87, Jun 1973. ISSN 0008-4301. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4197159> >.

ROSA, T. F. et al. The *Plasmodium falciparum* blood stages acquire factor H family proteins to evade destruction by human complement. *Cell Microbiol*, v. 18, n. 4, p. 573-90, Apr 2016. ISSN 1462-5822. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26457721> >.

SABCHAREON, A. et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*, v. 45, n. 3, p. 297-308, Sep 1991. ISSN 0002-9637. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1928564> >.

SAHA, A.; CHAUHAN, S.; BAGCHI, T. Effect of recombinant malarial antigen on monocyte functionality. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 110, n. 8, p. 480-6, 08 2016. ISSN 1878-3503. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27618921> >.

SALLARES, R.; BOUWMAN, A.; ANDERUNG, C. The spread of malaria to Southern Europe in antiquity: new approaches to old problems. *Med Hist*, v. 48, n. 3, p. 311-28, Jul 2004. ISSN 0025-7273. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16021928> >.

SAMPAIO, V. S. et al. Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 48 Suppl 1, p. 4-11, 2015. ISSN 1678-9849. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26061365> >.

SAMPATH, S. et al. Glycan masking of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein for probing protein binding function and vaccine development. *PLoS Pathog*, v. 9, n. 6, p. e1003420, 2013. ISSN 1553-7374. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23853575> >.

SAÚDE, S. D. V. E. Boletim Epidemiológico Núcleo de Comunicação da Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde, 2009.

SCHLESINGER Y, GRANOFF DM. Avidity and bactericidal activity of antibody elicited by different *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *JAMA*, v.267, p:1489–1494, 1992. doi: 10.1001/jama.1992.03480110065035.

SCHROEDER HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol*, v. 125 (2 Suppl 2), p.41-52, Feb 2010.

SEVERINI, C. et al. Risk of *Plasmodium vivax* malaria reintroduction in Uzbekistan: genetic characterization of parasites and status of potential malaria vectors in the Surkhandarya region.

Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 98, n. 10, p. 585-92, Oct 2004. ISSN 0035-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289095> >.

SHAKRI, A. R. et al. Development of quantitative receptor-ligand binding assay for use as a tool to estimate immune responses against *Plasmodium vivax* Duffy binding protein Region II. J Immunoassay Immunochem, v. 33, n. 4, p.403-13, 2012.

SILVA, R.; PAIVA, C. H. The Juscelino Kubitschek government and the Brazilian Malaria Control and Eradication Working Group: collaboration and conflicts in Brazilian and international health agenda, 1958-1961. Hist Cienc Saude Manguinhos, v. 22, n. 1, p. 95-114, 2015 Jan-Mar 2015. ISSN 1678-4758. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25742101> >.

SILVA-FILHO J. L. et al. *Plasmodium vivax* in Hematopoietic Niches: Hidden and Dangerous. Trends in Parasitology, v. 36, n.5, p.447-458, May 2020. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.03.002>

SILVIE, O. et al. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. Curr Opin Microbiol, v. 11, n. 4, p. 352-9, Aug 2008. ISSN 1369-5274. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18644249> >.

SINDEN, R. E. Sexual development of malarial parasites. Adv Parasitol, v. 22, p. 153-216, 1983. ISSN 0065-308X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6141715> >.

SINDEN, R. E. et al. The cell biology of malaria infection of mosquito: advances and opportunities. Cell Microbiol, v. 17, n. 4, p. 451-66, Apr 2015. ISSN 1462-5822. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25557077> >.

SINDEN, R. E.; CROLL, N. A. Cytology and kinetics of microgametogenesis and fertilization in *Plasmodium yoelii nigeriensis*. Parasitology, v. 70, n. 1, p. 53-65, Feb 1975. ISSN 0031-1820. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1118188> >.

SINGH, K. et al. Malaria vaccine candidate based on Duffy-binding protein elicits strain transcending functional antibodies in a Phase I trial. NPJ Vaccines, v. 3, p. 48, 2018. ISSN 2059-0105. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30302285> >.

SINGH, S. K. et al. Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. Biochem J, v. 374, n. Pt 1, p. 193-8, Aug 2003. ISSN 0264-6021. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12775212> >.

SOARES, I. S. et al. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. Am J Trop Med Hyg, v. 60, n. 3, p. 357-63, Mar 1999. ISSN 0002-9637. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10466961> >.

SOARES, I. S. et al. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. Infect Immun, v. 65, n. 5, p. 1606-14, May 1997. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9125537> >.

SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*.

Parasitology, v. 124, n. Pt 3, p. 237-46, Mar 2002. ISSN 0031-1820. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11922426> >.

SOUSA, T. N. et al. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian *Plasmodium vivax* populations. *Malar J*, v. 9, p. 334, Nov 2010. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21092207> >.

SOUZA-SILVA, F. A. et al. Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*, v. 82, n. 2, p. 185-93, Feb 2010. ISSN 1476-1645. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133990> >.

SOUZA-SILVA, F. A. et al. Duffy antigen receptor for chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-duffy binding protein II (DBPII) immunity. *PLoS One*, v. 9, n. 4, p. e93782, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24710306> >.

STAFFORD, W. H. et al. N-terminal amino acid sequence of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 polypeptides. *Mol Biochem Parasitol*, v. 66, n. 1, p. 157-60, Jul 1994. ISSN 0166-6851. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984180> >.

STANISIC, D. I. et al. Acquisition of antibodies against *Plasmodium falciparum* merozoites and malaria immunity in young children and the influence of age, force of infection, and magnitude of response. *Infect Immun*, v. 83, n. 2, p. 646-60, Feb 2015. ISSN 1098-5522. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25422270> >.

STORTI-MELO, L. M. et al. Evaluation of the naturally acquired antibody immune response to the Pv200L N-terminal fragment of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 in four areas of the Amazon Region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, v. 84, n. 2 Suppl, p. 58-63, Feb 2011. ISSN 1476-1645. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292879> >.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, v. 313, n. 5791, p. 1287-90, Sep 2006. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16888102> >.

SUH, I. B. et al. Reactivity of sera from cases of *Plasmodium vivax* malaria towards three recombinant antigens based on the surface proteins of the parasite. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 97, n. 5, p. 481-7, Jul 2003. ISSN 0003-4983. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12930610> >.

THOMSON-LUQUE, R. et al. From marginal to essential: the golden thread between nutrient sensing, medium composition and *Plasmodium vivax* maturation in in vitro culture. *Malar J*, v. 18, n. 1, p. 344, Oct 2019. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31601222> >.

TJITRA, E. et al. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Med*, v. 5, n. 6, p. e128, Jun 2008. ISSN 1549-1676. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18563962> >.

TOMARAS, G. D. et al. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol*, v. 82, n. 24, p. 12449-63, Dec 2008. ISSN 1098-5514. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18842730> >.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, v. 193, n. 4254, p. 673-5, Aug 1976. ISSN 0036-8075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/781840> >.

TRAN, T. M. et al. Comparison of IgG reactivities to *Plasmodium vivax* merozoite invasion antigens in a Brazilian Amazon population. *Am J Trop Med Hyg*, v. 73, n. 2, p. 244-55, Aug 2005. ISSN 0002-9637. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103583> >.

TRUBOWITZ, S.; MASEK, B. *Plasmodium falciparum*: phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *Science*, v. 162, n. 3850, p. 273-4, Oct 1968. ISSN 0036-8075. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4877439> >.

TSUBOI, T. et al. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein. *Infect Immun*, v. 62, n. 12, p. 5581-6, Dec 1994. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7960140> >.

TUTTERROW YL, Salanti A, Avril M, Smith JD, Pagano IS, Ako S, et al. High avidity antibodies to full-length VAR2CSA correlate with absence of placental malaria. *PLoS ONE*, v.7, p:e40049, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0040049.

UDOMSANGPETCH, R. et al. Cultivation of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol*, v. 24, n. 2, p. 85-8, Feb 2008. ISSN 1471-4922. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18180202> >.

URUSOVA, D. et al. Structural basis for neutralization of *Plasmodium vivax* by naturally acquired human antibodies that target DBP. *Nat Microbiol*, v. 4, n. 9, p. 1486-1496, Sep 2019. ISSN 2058-5276. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31133752> >.

VALDERRAMA-AGUIRRE, A. et al. Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of *Plasmodium vivax* MSP1 PV2001: a potential malaria vaccine subunit. *Am J Trop Med Hyg*, v. 73, n. 5 Suppl, p. 16-24, Nov 2005. ISSN 0002-9637. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16291762> >.

VALIZADEH, V. et al. Non-allele specific antibody responses to genetically distinct variant forms of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (PvDBP-II) in Iranians exposed to seasonal malaria transmission. *Acta Trop*, v. 136, p. 89-100, Aug 2014. ISSN 1873-6254. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704284> >.

VALLEJO, A. F. et al. Malaria systems immunology: *Plasmodium vivax* induces tolerance during primary infection through dysregulation of neutrophils and dendritic cells. *J Infect*, v. 77, n. 5, p. 440-447, 11 2018. ISSN 1532-2742. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30248353> >.

VANBUSKIRK, K. M. et al. Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium vivax* duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. *J Infect Dis*, v. 190, n. 9, p. 1556-62, Nov 2004. ISSN 0022-1899. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15478059> >.

VANBUSKIRK, K. M.; SEVOVA, E.; ADAMS, J. H. Conserved residues in the *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein ligand domain are critical for erythrocyte receptor recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101, n. 44, p. 15754-9, Nov 2004. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15498870> >.

VIJAYAN, A.; CHITNIS, C. E. Development of Blood Stage Malaria Vaccines. *Methods Mol Biol*, v. 2013, p. 199-218, 2019. ISSN 1940-6029. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31267504> >.

VLACHOU, D. et al. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev*, v. 16, n. 4, p. 384-91, Aug 2006. ISSN 0959-437X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16793259> >.

WANG, Q. et al. Naturally Acquired Antibody Responses to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) C-Terminal 19 kDa Domains in an Area of Unstable Malaria Transmission in Southeast Asia. *PLoS One*, v. 11, n. 3, p. e0151900, 2016. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26999435> >.

WHITE, N. J. et al. Malaria. *Lancet*, v. 383, n. 9918, p. 723-35, Feb 2014. ISSN 1474-547X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23953767> >.

WHO. World Malaria Report. Geneva 2019

WHO. World Malaria Report. Geneva 2018

WHO. World Malaria Report. Geneva 2012

WICKRAMARACHCHI, T. et al. Comparison of naturally acquired antibody responses against the C-terminal processing products of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. *Int J Parasitol*, v. 37, n. 2, p. 199-208, Feb 2007. ISSN 0020-7519. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055511> >.

WURTZ, N. et al. Vivax malaria in Mauritania includes infection of a Duffy-negative individual. *Malar J*, v. 10, p. 336, Nov 2011. ISSN 1475-2875. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22050867> >.

XIA, H. et al. A comparative study of natural immune responses against *Plasmodium vivax* C-terminal merozoite surface protein-1 (PvMSP-1) and apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) in two endemic settings. *EXCLI J*, v. 14, p. 926-34, 2015. ISSN 1611-2156. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26713085> >.

YILMAZ, B. et al. Gut microbiota elicits a protective immune response against malaria transmission. *Cell*, v. 159, n. 6, p. 1277-89, Dec 2014. ISSN 1097-4172. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25480293> >.

YMAN, V. et al. Antibody acquisition models: A new tool for serological surveillance of malaria transmission intensity. *Sci Rep*, v. 6, p. 19472, Feb 2016. ISSN 2045-2322. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26846726> >.

ZAKERI, S. et al. Antibody responses and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium vivax* Duffy binding protein (PvDBP) antibodies in individuals from an area with unstable malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg*, v. 84, n. 6, p. 944-50, Jun 2011. ISSN 1476-1645. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633032> >.

ZEYREK, F. Y. et al. Analysis of naturally acquired antibody responses to the 19-kd C-terminal region of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* from individuals in Sanliurfa, Turkey. *Am J Trop Med Hyg*, v. 78, n. 5, p. 729-32, May 2008. ISSN 1476-1645. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18458304> >.

Anexo 1

PLOS ONE

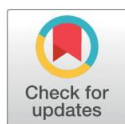
RESEARCH ARTICLE

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

Camila M. P. Medeiros^{1,2}, Eduardo U. M. Moreira¹, Camilla V. Pires¹, Letícia M. Torres^{1,2}, Luiz F. F. Guimarães¹, Jéssica R. S. Alves¹, Bárbara A. S. Lima¹, Cor J. F. Fontes³, Helena L. Costa¹, Cristiana F. A. Brito¹, Tais N. Sousa¹, Francis B. Ntumngia⁴, John H. Adams⁴, Flora S. Kano^{1*}, Luzia H. Carvalho^{1,2*}

1 Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ Minas, Belo Horizonte, MG, Brazil, **2** Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, **3** Hospital Júlio Muller, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil, **4** Center for Global Health and Infectious Diseases Research, College of Public Health, University of South Florida, Tampa, Florida, United States of America

* luzia.carvalho@fiocruz.br (LHC); flora.kano@fiocruz.br (FSK)



OPEN ACCESS

Citation: Medeiros CMP, Moreira EUM, Pires CV, Torres LM, Guimarães LFF, Alves JRS, et al. (2020) 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 15(5): e0232786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232786>

Editor: Takafumi Tsuboi, Ehime Daigaku, JAPAN

Received: January 27, 2020

Accepted: April 21, 2020

Published: May 7, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232786>

Copyright: © 2020 Medeiros et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are available within the article and its Supporting Information files.

Abstract

Background

A low proportion of *P. vivax*-exposed individuals acquire protective strain-transcending neutralizing IgG antibodies that are able to block the interaction between the Duffy binding protein II (DBPII) and its erythrocyte-specific invasion receptor. In a recent study, a novel surface-engineered DBPII-based vaccine termed DEKnull-2, whose antibody response target conserved DBPII epitopes, was able to induce broadly binding-inhibitory IgG antibodies (BIABs) that inhibit *P. vivax* reticulocyte invasion. Toward the development of DEKnull-2 as an effective *P. vivax* blood-stage vaccine, we investigate the relationship between naturally acquired DBPII-specific IgM response and the profile of IgG antibodies/BIABs activity over time.

Methodology/principal findings

A nine-year follow-up study was carried-out among long-term *P. vivax*-exposed Amazonian individuals and included six cross-sectional surveys at periods of high and low malaria transmission. DBPII immune responses associated with either strain-specific (Sal1, natural DBPII variant circulating in the study area) or conserved epitopes (DEKnull-2) were monitored by conventional serology (ELISA-detected IgM and IgG antibodies), with IgG BIABs activity evaluated by functional assays (*in vitro* inhibition of DBPII-erythrocyte binding). The results showed a tendency of IgM antibodies toward Sal1-specific response; the profile of Sal1 over DEKnull-2 was not associated with acute malaria and sustained throughout the observation period. The low malaria incidence in two consecutive years allowed us to

Funding: This work was supported by The National Research Council for Scientific and Technological Development-CNPq (422257/2016-8 by LHC); The Research Foundation of Minas Gerais- FAPEMIG (APQ-02625-15 by LHC); Programa Fiocruz de Fomento à Inovação: Inova Fiocruz (VPPCB-007-FIO-18-2-33 by FSK); NIH Research Project Grant Program (R01AI064478 by JHA and LHC). LHC, CFAB, TNS and CFJF are research fellows from CNPq. Scholarships were sponsored by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel-CAPEs (BASL, JRSA, LFFG and LMT) and CNPq (CMPM, HLC, CVP and EUMM). We also thank the financial support from the Program for Institutional Internationalization of the Higher Education Institutions and Research Institutions of Brazil-CAPEs-Print from FIOCRUZ and UFMG. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

demonstrate that variant-specific IgG (but not IgM) antibodies waned over time, which resulted in IgG skewed to the DEKnull-2 response. A persistent DBPII-specific IgM response was not associated with the presence (or absence) of broadly neutralizing IgG antibody response.

Conclusions/significance

The current study demonstrates that long-term exposure to low and unstable levels of *P. vivax* transmission led to a sustained DBPII-specific IgM response against variant-specific epitopes, while sustained IgG responses are skewed to conserved epitopes. Further studies should investigate on the role of a stable and persistent IgM antibody response in the immune response mediated by DBPII.

Introduction

Plasmodium vivax is characterized by dormant liver stage hypnozoite-parasites responsible for high frequency of relapses [1], which imposes a challenge for the current policies of malaria control and elimination. With great potential for transmission from first generation of blood-stage infection [2, 3] and lower levels of parasitemia often undetected by routine surveillance [4, 5], the proportion of malaria infections attributed to *P. vivax* has increased in areas of relatively low transmission [6].

Although there are major hurdles for vivax malaria elimination, clinical immunity to *P. vivax* is acquired much more rapidly than for *P. falciparum* [revised in [7, 8], even in low transmission settings, which make the development of an effective vaccine worth pursuing. Duffy binding protein II (DBPII) is a leading *P. vivax* malaria vaccine candidate that binds the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) on reticulocytes is critical for reticulocyte invasion [9, 10]. Although naturally acquired DBPII antibodies tend to be biased towards strain-specific responses [11–13], our project identified the epitope targets of protective neutralizing IgG antibody response to overlap conserved residues essential for receptor binding and DBP dimerization [12, 14–19]. Individuals able to produce these broadly binding-inhibitory antibodies (BIAb) to DBPII present reduced risk of clinical *P. vivax* malaria [20, 21]. In pursuing a structural vaccinology approach, our project created surface-engineered DBPII vaccine candidate, DEKnull-2, that retains the conserved functional epitopes needed for receptor binding and DBP dimerization but removed residues of variant nonfunctional epitopes associated with strain-specific immune responses [22]. Naturally-occurring protective immunity associated with induction of long-term memory IgG responses have anti-DBPII BIAb and DBPII reactive cells that are highly reactive with DEKnull-2.

While it is well established that naturally acquired IgG antibody responses are associated with protective clinical immunity to blood-stage malaria [23, 24], the role of IgM is not well defined [25, 26]. A recent study in a murine model of malaria demonstrated that *Plasmodium*-specific IgM memory B cells are somatically hypermutated, high-affinity, and dominate the early memory response to recurring malaria infections [27]. Likewise, the production of protective IgM antibodies during experimental malaria provides evidence of additional mechanisms by which the immune system controls *Plasmodium* infection [28, 29]. These results might explain recent data associating the depth and breadth of *Plasmodium*-specific IgM antibodies with genetic resistance to malaria infection [30], and with the reduced risk of clinical

malaria in a cohort of children [31]. Taken together, we are in accordance with other that suggest that IgM antibodies seem to be much more than just an early responder to malaria infection [32], and should be investigated during the development of vaccines.

Therefore, the goal of this study is to understand the mechanisms that underlie the broader humoral immune responses against the novel engineered DBPPII vaccine candidate, DEKnull-2 [22], including the IgM response. For that, we took advantage of the long-term follow-up study previously carried out in the Amazon rainforest, where different profiles of DBPPII-specific IgG responders were identified [33]. We have examined the frequency and distribution of DBPPII-specific IgM and IgG antibodies during a 9-years follow-up period. As IgM antibodies may be necessary to sustain an optimal long-term protective IgG response [34–36], we also investigate whether a stable DBPPII-specific IgM response could interfere with the profile of antibodies able to block the interaction ligand-receptor.

Materials and methods

Study area and population

The study was carried-out in the agricultural settlement of Rio Pardo (1°46'S—1°54'S, 60°22'W—60°10'W), Presidente Figueiredo municipality, Northeast of Amazonas State in the Brazilian Amazon region. The study site and malaria transmission patterns were described in detail elsewhere [37–39]. In this area, malaria transmission is considered hypo to mesoendemic, and the majority of residents were natives of the Amazon region [37]. Inhabitants of the settlement live on subsistence farming and fishing along the small streams. In the study area, *P. falciparum* malaria incidence has decreased drastically in recent years, and *P. vivax* is now responsible for all clinical malaria cases reported (S1 Fig).

Study design and cross-sectional surveys

A population-based open cohort study was initiated in November of 2008, and included three cross-sectional surveys carried at six-months interval (baseline, 6 and 12-months) as previously reported [37, 39]. Briefly, (i) interviews were conducted through a structured questionnaire to obtain demographical, epidemiological, and clinical data; (ii) physical examination, including body temperature and spleen/liver size were recorded according to standard clinical protocols; (iii) venous blood was collected for individuals aged five years or older (EDTA, 5 mL), or blood spotted on filter paper (finger-prick) for those aged <5 years; and (iv) examination of Giemsa-stained thick blood smears for the presence of malaria parasites by light microscopy. The geographical location of each dwelling was recorded using a hand-held 12-channel global positioning system (GPS) (Garmin 12XL, Olathe, KS, USA) with a positional accuracy of within 15 m. Additional cross-sectional surveys were carried-out six (August 2014), seven (July 2015) and nine years later (July 2017) [22, 33]. During the long-term follow up study, the number of malaria cases fluctuated in the study area, reflecting period of high (I and III) and low (II) malaria transmission (S1 Fig). For the current study, the non-eligible criteria were (i) refusal to sign the informed consent; (ii) children, as clinical immunity is not prevalent in Amazon children [40]; (iii) pregnant women; (iv) any other morbidity that could be traced; and (v) individuals who were unable to be recruited during at least two consecutive cross-sectional surveys. The 163 participants who were eligible to the current study matched the original adult population ($n = 300$) for age, sex, malaria exposure [33]. Eighty-eight (54%) and 77 (47%) out of 163 eligible subjects could be recruited six and nine years later, respectively. Fifty-seven (35%) subjects presented consecutive samples throughout the 9-years follow-up period.

The ethical and methodological aspects of this study were approved by the Ethical Committee of Research on Human Beings from the René Rachou Institute (Reports No. 007/2006, No. 07/2009, No.12/2010, No. 26/2013 and CAAE 50522115.7.0000.5091), according to the Resolutions of the Brazilian Council on Health (CNS-196/96 and CNS-466/2012).

Laboratory diagnosis of malaria

At the time of blood collection, all individuals were submitted to a finger-prick for malaria diagnosis by light microscopy. The Giemsa-stained thick blood smears were prepared and examined by experienced local microscopists, according to the malaria diagnosis guidelines of the Brazilian Ministry of Health (2009) [41]. Species-specific PCR assays targeting different plasmodial targets (*18S rRNA* gene and non-ribosomal Pvr47/Pfr364 sequences) were carried-out essentially as previously described [42]. For this, genomic DNA was extracted from either whole blood samples collected in EDTA, or from dried blood spots on filter paper using the Puregene blood core kit B (Qiagen, Minneapolis, MN, USA) or the QIAmp DNA mini kit (Qiagen), respectively, according to manufacturers' instructions.

Recombinant blood stage *P. vivax* proteins

DBPII-related antigens. Recombinant DBPII-related proteins included amino acids 243–573 of the Sal-1 reference strain, DBPII-Sal1 [43], and an engineered DBPII termed DEKnull-2 [22]. These proteins were expressed as a 39kDa 6xHis fusion protein, properly refolded, as previously described [16, 22].

Immunoglobulin (Ig) M and IgG detection assays

A conventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antigen-specific IgM and IgG antibody response was carried out as previously described [38], with plasma samples diluted at 1:100 (IgG) or 1:400 (IgM). Recombinant proteins were used at a final concentration of 3 µg/ml (DBPII and DEKnull-2). For each protein, the results were expressed as ELISA reactivity index (RI), calculated as the ratio of the mean optical density (OD at 492 nm) of each sample to the mean OD plus three standard deviations of samples from 20–30 unexposed volunteers. Values of RI > 1.0 were considered positive.

Anti-DBPII erythrocyte-binding-inhibitory antibodies

The functional proprieties of DBPII antibodies (binding-inhibitory activity, BIABs) were performed on a subset of the study population comprising 57 individuals matched for age, sex and malaria exposure. Plasma samples were tested for inhibition of DBPII-erythrocyte binding at 1:40 dilution by the standard COS7 cell assay as described [44]. A pool of *P. vivax* immune serum able to inhibit erythrocyte binding, and naïve serum was used as positive and negative control respectively. Binding was quantified by counting rosettes observed in 10–20 fields of view (x200). Percent binding-inhibition was quantified by assessing the percentage of rosettes in wells of transfected cells in the presence of test plasma relative to rosettes in wells in the presence of negative control plasma sample. Plasma samples with more than 50% inhibition of DBPII-erythrocyte binding were considered inhibitory.

Statistical analysis

A database was created using Epidata software (<http://www.epidata.dk>). The graphics and the analysis were performed using GraphPad Prism version 7—GraphPad Software, La Jolla California USA, and R statistical software (version 3.3.3). Differences in proportions were

evaluated by chi-square (X^2) test or Fisher's exact tests, as appropriate. The Shapiro-Wilk test was performed to evaluate normality of variables. Differences in means were tested using either the one-way ANOVA, with Turkey's post hoc, or the Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis tests, with Dunn's post hoc test, as appropriate. Linear correlation between variables, such as levels of antibodies and recent episodes of malaria, was determined by using the Spearman's correlation coefficient. Only variables associated with statistical significance at the 5% level were maintained in the final models.

Results

Subject characteristics and antibody profiles to DBPII-related antigens at enrollment

The median age of individuals included in the study was 42 years (IQR: 28–53) with a 1.1:1 proportion of male to female (Table 1). The age was significantly associated with a subject's time of malaria exposure in the Amazon area ($r = 0.75$; $p < 0.0001$, Spearman's correlation test). At the time of their first blood collection, the overall prevalence of malaria was 13%, with all infections caused exclusively by *P. vivax*; 3% of infections were detected by conventional microscopy, and 10% by a species-specific Real-Time PCR.

To determining whether DBPII antibody responses included both strain specific and broadly reactive antibodies, two different DBPII allelic variants were tested, Sal1, a common variant circulating in the study area and the DBPII reference strain, and the engineered DEKnull-2 whose antibody response target conserved DBPII epitopes. While 39% of the individuals enrolled in the study had IgM antibodies to DBPII-Sal1, only 23% had detectable IgM antibodies to the conserved DEKnull-2 ($X^2 = 9.698$ $p = 0.018$). Considering IgG antibodies, a similar proportion of individuals (46–43%) responded to each of recombinant protein assayed ($p > 0.05$).

Table 1. Demographic, epidemiological and immunological characteristics of 163 individuals at enrolment.

Characteristics		
Median age, years (IQR)		42 (28–53)
Gender, male: female		1.1: 1
Previous malaria self-reported episodes, median (IQR)		5 (3–15)
Years of residence in Amazon area, median (IQR)		35 (24–50)
Location of residence in Amazon area, riverine: non-riverine		1: 1
Acute <i>P. vivax</i> infection:		
	Patent <i>P. vivax</i> infection ¹ , <i>n</i> (%)	5 (3)
	Sub patent <i>P. vivax</i> infection ² , <i>n</i> (%)	17 (10)
	Total, <i>n</i> (%)	22 (13)
Antibody response ³ , positive <i>n</i> (%):		
IgM*	DBPII-Sal1	64 (39)
	DEKnull-2	37 (23)
IgG	DBPII-Sal1	75 (46)
	DEKnull-2	69 (43)

IQR = InterQuartile Range.

¹Positive *P. vivax* infections detected by conventional light microscopy.

²Positive *P. vivax* infections detected by real-time PCR.

³Evaluated by conventional ELISA serology using recombinant proteins against *P. vivax* Duffy binding protein region II (DBPII).

*Statistically different (Chi Square test with Yates correction, $X^2 = 9.698$; $p = 0.018$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232786.t001>

Composition and dynamics of strain-specific and strain-transcending DBP-II antibody repertoire over a nine-year period

IgM DBP-II-related response. Over three cross-sectional surveys at 6-month intervals (high transmission, Phase I), between 40% and 37% of individuals had DBP-II-Sal1 IgM antibodies, as detected by conventional serology (S2 Fig). Broadly reactive antibodies (DEKnull-2) were detected at significantly lower frequencies (24–16%). During all follow-up period DBP-II-Sal1 IgM antibodies predominate over DEKnull-2 antibodies, and it was independent of the levels of malaria transmission in the study area (phase I, II and III). The levels of antibodies (evaluated here by medians of reactivity) showed a similar tendency towards strain-specific IgM antibodies (S2 Fig and S1 Table).

IgG DBP-II-related response. The frequencies and levels of IgG antibody response to both DBP-II proteins were similar over the first 12-months period (phase I) (S3 Fig). Despite of that, antibody levels varied among responders, including individuals with strong IgG antibody response ($RI > 10$) to both DBP-II-related antigens. Of interest, the intensity of malaria transmission influenced in the proportion of Sal-1 versus DEKnull-2 immune responses. In the low transmission period (phase II), a significant decrease in strain-specific IgG antibodies was observed while the frequencies and levels of DEKnull-2 remained similar to the baseline (47% vs. 45–39%) (S3 Fig and S1 Table). The profile of DEKnull-2 over Sal1-specific IgG response was maintained until the end of the study (phase III, high transmission).

Ratio IgG to IgM antibodies. The ratio IgG/IgM to each recombinant protein confirmed that IgG but not IgM Sal1-antibodies were sensitive to malaria transmission intensity (Fig 1). Anti-Sal1 IgG antibodies decreased during a transmission period, and this profile remained until the end of the study. The low malaria transmission period strengthened DEKnull-2 antibodies, especially for IgG antibodies (Fig 1B).

Influence of acute infection in the DBP-II antibody repertoire

During the 9-years follow-up study period, 42 (26%) out of 163 studied individuals had a detectable *P. vivax* infection, most of them detected only during the first 12-month period ($n = 36$, Phase I). Although this subgroup was not differentiated from the study population by age (42 vs. 39 yrs-old), gender (1.3:1 vs. 1.1:1), or time of malaria-exposure (34 vs. 33 yrs), the majority of them were classified as riverine population (30 out of 42, 71%).

In these long-term exposed individuals, there was a predominance of sub patent (PCR-positive) over patent (microscopy-positive) *P. vivax* infections, and acute infection was not associated with the presence of either IgM or IgG antibody responses to any of the proteins, i.e., Sal1 or DEKnull-2 (Fig 2). Specifically, individuals with persistent malaria infection (for example, RP553 and RP555) did not present DBP-II-related IgM antibodies, and vice-versa, a persistent IgM antibody response to both proteins (RP416 and RP516) was not associated with a potential booster by blood-stage infections. The absence of correlation between infection and antibody response was also observed for IgG antibodies (RP405, RP416 and RP433). This data is confirmed by the Spearman's correlation coefficient between IgG and IgM antibody responses (S4 Fig).

IgG and IgM antibodies repertoire according to the immunological background

Plasma samples were screened for anti-DBP-II BIAs to investigate the relationship between IgM/ IgG antibody responses and the profile of BIAs responders' DBP-II inhibitory immune responses. These were classified as persistent non-responders (NR) characterized by the

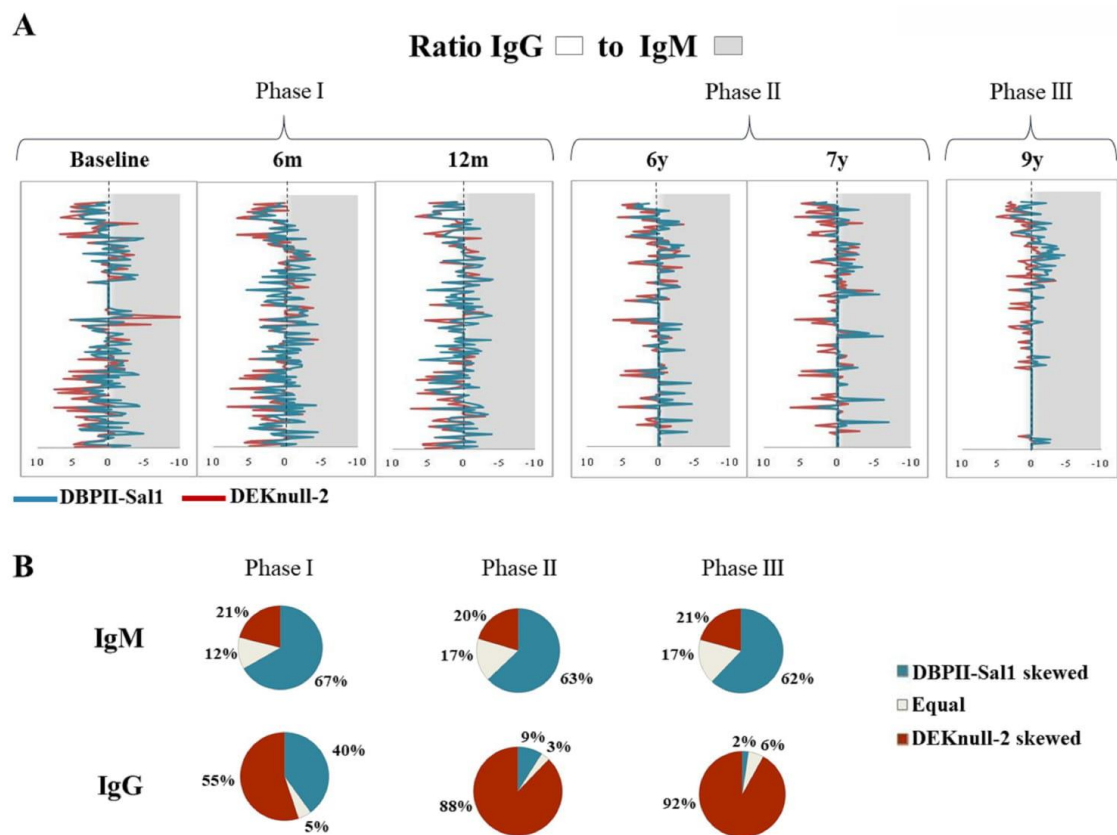


Fig 1. Ratio of IgG to IgM antibody responses against DBP-II-SalI and DEKnull-2 during the 9 years follow-up study period. (A) The ratio between IgG and IgM response against DBP-II-SalI (blue line) and DEKnull-2 (red line) for all subjects enrolled in the study was represented for each cross-sectional survey. The longitudinal study comprised six cross-sectional surveys, which included periods of high (phase I and III) and low (phase II) malaria transmission; the first three cross-sectional surveys were carried-out during the first year (baseline, 6 and 12 months), and three carried-out 6th, 7th and 9th years later. Individual responses towards IgG were represented on left (white) and towards IgM on right (grey). Individuals with equal IgG and IgM responses were shown on central dotted line. (B) Pie charts representing the percentage of subjects with the following IgG and IgM response profiles: DBP-II-SalI skewed, equal, and DEKnull-2 skewed during the three phases of transmission.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232786.g001>

absence of BIAs antibodies; temporary responders (TR) whose BIAs response alternated between positive/negative, and persistent responders (PR) whose BIAs were stable throughout the study (Fig 3). During the low transmission period (Phase II), IgG responses were consistently detected against both recombinant proteins (DBP-II-SalI and DEKnull-2) for the persistent BIAs responders and, less with the temporary BIAs responders. All but one (RP416) of PR subgroup (93%, $n = 15$) had DEKnull-2 IgG antibodies, while only 7 out of 13 (54%) of TR reacted to DEKnull-2. As expected, the majority of NR did not have detectable long-term IgG. IgM antibody responses were not associated with any profile of BIAs responders, with some individuals with broadly and long-term IgM responses detected in all subgroups (Fig 3).

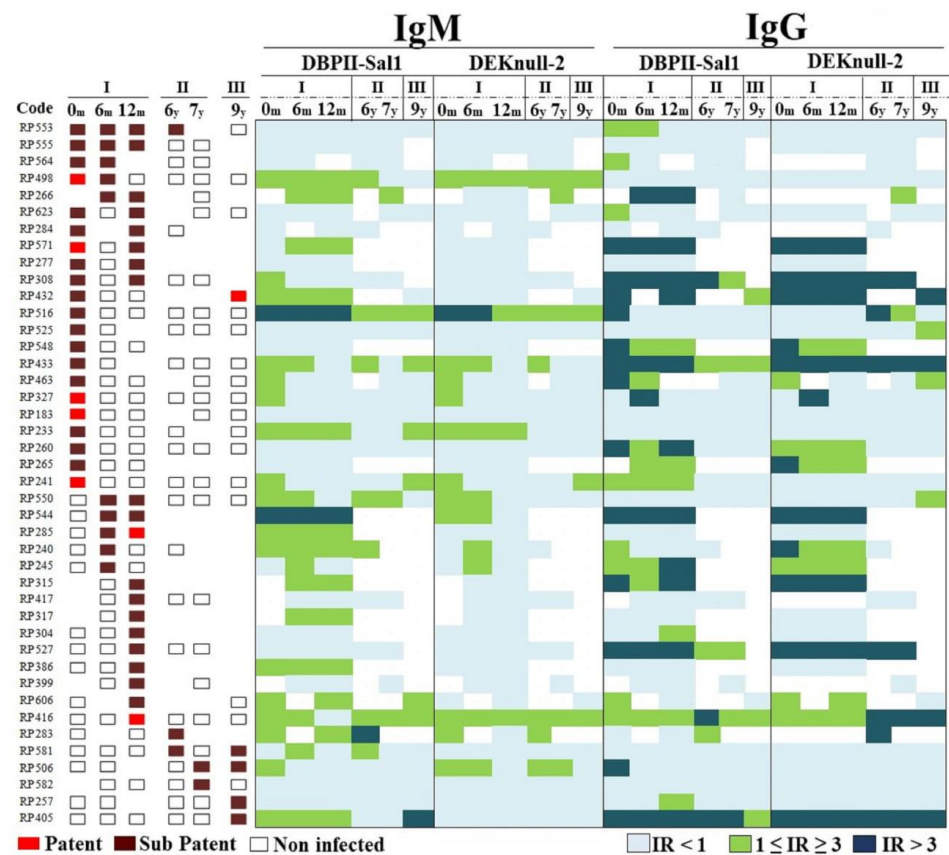


Fig 2. IgM and IgG antibody responses to DBP-II-Sal1 and DEKnull-2 during *P. vivax* infections. Each line represents one subject who had detectable *P. vivax* blood stage infection at any time of the follow-up study. The longitudinal study comprised six cross-sectional surveys, which included periods of high (I and III) and low (II) malaria transmission; the first three cross-sectional surveys were carried-out during the first year (zero, 6 and 12 months; 0-12m), and three carried-out 6th, 7th and 9th years later (6-9y). Forty-two subjects were positive for *P. vivax* infections and classified into *sub patent* and *patent* infection accordingly to PCR or conventional microscopy diagnosis, respectively (red color variation). In the right panel, the green color variation in the heatmap shows IgM and IgG responses for each cross-sectional survey. ELISA antibody responses were expressed as Reactivity Index (RI) calculated by dividing the mean optical density (OD at 492 nm) of each sample to the mean OD plus three standard deviations of samples from unexposed volunteers. Values of RI > 1.0 were considered positive (on a green scale).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232786.g002>

Discussion

In an Amazonian community exposed to low levels intermittent malaria transmission, we sought to investigate the relationship between anti-DBP-II IgM and IgG antibody responses reactive with strain-specific (Sal1) or strain-transcending (DEKnull-2) immune responses [22]. In general, the frequencies and levels of IgM antibodies showed a tendency towards strain-specific antibodies (Sal1). Interestingly, the response profile of Sal1 over DEKnull-2 IgM antibodies was sustained throughout the 9-years observation period, including in consecutive years in which malaria transmission dropped drastically in the study area (Phase II).

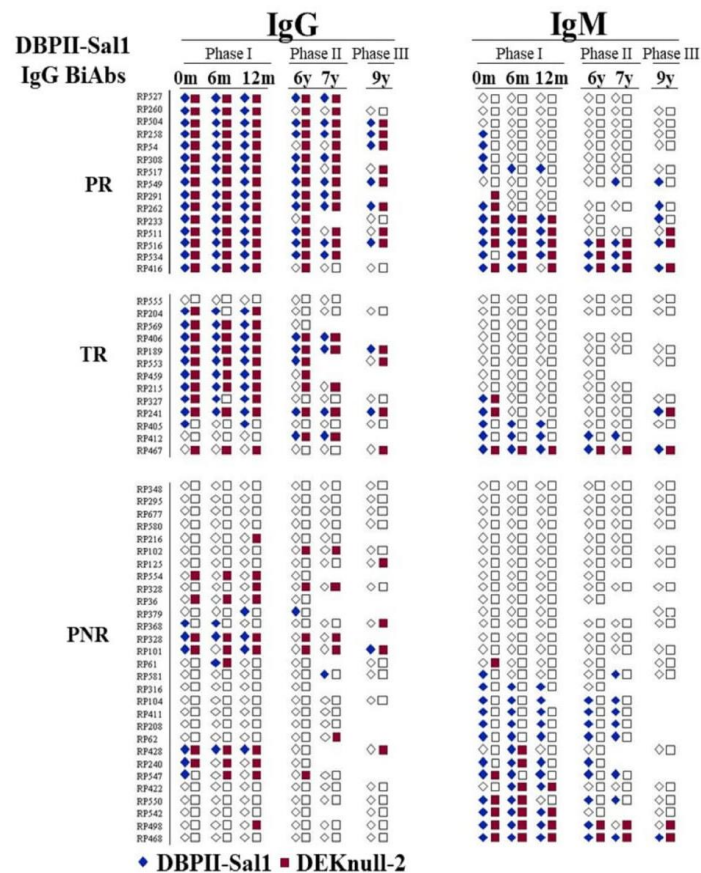


Fig 3. Profile of IgM and IgG antibody responses of Rio Pardo subjects previously classified according to the DBP-II Binding Inhibitory Antibodies (BIAbs). According to their BIABs response, malaria-exposed individuals ($n = 57$) were previously characterized as [22]: i) *Persistent responder (PR)*, who had BIABs response during the 9 years of follow-up; ii) *Temporary responders (TR)*, who had variable BIABs response during those cross-sectional surveys and iii) *Persistent non-responders (NR)*, who had no BIABs detected any time in the study. Each line represents individual IgM and IgG antibody responses against DBP-II-Sal1 or DEKnull-2, in each cross-sectional survey. Colored symbols indicate positive antibody response at ELISA ($IR > 1$) and white symbols negative response at ELISA ($IR \leq 1$). ELISA results were expressed as Reactivity Index (RI), with Reactivity Index (RI) > 1 considered positive.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232786.g003>

Although the majority of high IgM responses ($RI > 3$) were no longer detected in the low transmission period, the results suggest that individuals in *P. vivax*-endemic Amazonian communities were able to sustain their DBP-II-specific IgM antibody responses. These results may explain recent findings showing that IgM-expressing memory B cells are expanded in malaria patients living in endemic areas [27], and confirm data from other studies, which suggest that IgM antibodies may play an underappreciated role in immune response against malaria infections [29–31]. Although scant longitudinal data are available about secondary IgM responses in *P. vivax*-exposed populations, a recent prospective study undertaken in a low transmission area of Western India demonstrated that *P. vivax* alters peripheral B-cell profiles and induces

parasite-specific IgM that persisted post recovery [45]. While the results from India are in concordance with a persistent IgM response, antigen-specific antibody responses were evaluated only over a short period-of time, i.e., during acute infection and upon 30 days post-treatment. Here, we demonstrated that long-term *P. vivax* exposure to low and unstable levels of malaria transmission can lead to a sustained DBP11-specific IgM response. At this time, it is not possible to define if this persistent DBP11-related IgM response could indicate that IgM-experienced B cells need to be constantly activated or if this response is rather associated with a bona-fide memory [29, 46]. Of relevance, *P. falciparum*-specific IgM antibodies were detected for more than 6 months in Australians returning from malaria endemic areas [31]. Together, the findings of long-term IgM response emphasize the need to understand the role of the IgM specific antibodies in both natural infection and vaccine antigens.

Our results showing an absence of correlation between antigen-specific IgM antibodies and acute malaria infection are intriguing, considering that in response to infection the antibodies made initially are usually IgM confined to the intravascular pool [26, 47]. Although unknown, we hypothesize that antigenically distinct DBP11 variants could be responsible to new blood-stage infections, including relapses. Still, this hypothesis may not explain many of the acute infections since Sal1 was the most prevalent DBP11 variant circulating at that time in the study area [37]. As sub patent infections predominate in the study area (77% by PCR vs. 23% by microscopy), one may speculate that these low parasite densities were not sufficient to provide a booster of IgM antibody response. However, recent findings in experimental malaria infections demonstrated that secondary IgM response was not affected by either challenge dose or the time of rechallenge [27]. Perhaps a more plausible and not mutually exclusive explanation for why IgM antibodies were not associated with peripheral blood stage infections is the relative underrepresentation of *P. vivax* asexual stages in patient blood [48, 49]. Nowadays, a considerable body of evidence indicates a tissue reservoir, such as bone marrow, where most *P. vivax* parasite burden resides [50]. Consequently, we cannot exclude that *P. vivax*-specific IgM production is dependent upon tissue parasite persistence, a phenomenon that needs to be investigated. In different experimental models, low-level of chronic infection may provide sufficient antigen to maintain IgM plasmablasts in the bone marrow either through inflammation [51] or antigenic stimulation [52].

From high to low malaria incidence in two consecutive years of the study was critical to elucidate the relative contribution of IgG versus IgM antibodies to DBP11 immune response. Variant-specific IgG but not IgM antibodies waned over time, which resulted in IgG skewed reactivity to the DEKnull-2 antigens lacking the variant epitopes but retaining the conserved epitopes. This profile of IgG response was not unexpected as we previously demonstrated that a significant number of long-term malaria-exposed individuals mount a strong and stable IgG response toward conserved DEKnull-2 epitopes [22, 33]. Of further interest, the levels of IgM antibodies were not related to IgG antibodies, and the lack of correlation occurred to both DBP11-related antigens. It has been proposed that the correlation (or not) between IgG/IgM in malaria may reflect inherent structural differences between antigens, including the relative conservation of the epitopes that are targeted; for example, strong correlations between IgG and IgM was observed to MSP2, whereas this was not seen with MSP1-19 and AMA-1 [53]. In the case of *P. vivax* MSP1, antibody response to different regions of the protein appeared distinct, with the N-terminal portion predominantly associated with IgM antibodies and C-terminal with IgG response [54–57]. In the case of DBP11, several studies have mapped functional immunoreactive B cell epitopes associated with broadly neutralizing IgG antibody response [12, 14, 15, 18], but no data is available about IgM response.

It has been shown that IgM antibodies may be necessary to sustain an optimal long-term protective IgG response [34–36]. Assuming that functionally acquired IgG antibodies able to

broadly inhibit DBP-II-DARC interaction (BIAbs) are associated with a reduced risk of clinical *P. vivax* malaria [20, 21], we sought to investigate whether a stable DBP-II-specific IgM response could interfere with the profile of BIAbs responder. It is particularly relevant as we demonstrated that long-term DEKnull-2 responders with high levels of IgG antibodies are able to produce a persistent BIAbs response [22]. Stratification of the DBP-II BIAbs responders (persistent, temporary and no-responder) showed no association (positive or negative) between antigen-specific IgM response and the profile of BIAbs. Additional investigation may help define the contribution (if any) of anti-DBP-II IgM antibodies in the immune response mediated by *P. vivax*.

The present study has limitations that must be considered when interpreting the results. As DBP-II sequences from all cross-section surveys were not available, antibody response against a DBP-II variant circulating in the study area (Sal1) was used to characterize species-specific immune response. Our previous studies confirm Sal1 as major local DBP-II variant [37, 58, 59], whose antibody response is highly prevalent in Amazonian exposed-individuals [33, 38]. Consequently, we are confident that Sal1 is a key DBP-II variable for assessing the species-specific immune response in the study area. Taken together, our results demonstrated that IgG (but not IgM) variant-specific DBP-II antibodies were poorly sustained at low transmission period, which confirms that IgM antibodies may be more indicative of continuous exposure to malaria, whereas epitope-conserved IgG antibodies are relatively stable and associated with BIAbs response. The reason for the persistence of the IgM response in our cohort merits further investigations.

Supporting information

S1 Fig. Temporal distribution of malaria cases in the agricultural settlement of Rio Pardo (Amazonas, Brazil) during 9 years follow-up study. *P. vivax* (blue) and *P. falciparum* (red) microscopy diagnosed case report data in Rio Pardo were provided by the National Malaria Surveillance Information System (SIVEP-Malaria) and plotted per month. The longitudinal study comprises six cross-sectional surveys during 2008–2017, which includes periods of high (dark-grey, phase I and III) and low (light-grey, phase II) malaria transmission; the first three cross-sectional surveys were carried-out during the first year (baseline, 6 and 12 months); three carried-out 6th, 7th and 9th years later. Modified from Pires *et al.*, 2018 [33]. (TIF)

S2 Fig. The levels of IgM antibody response against DPBII-Sal1 and DEKnull-2 during the study period. The IgM responses were expressed as Reactivity Index (RI), with Reactivity Index (RI) > 1.0 considered positive. The individual values are represented by blue (DBP-II--Sal1) and red (DEKnull-2) open circles. Transversal lines indicate medians and interquartile ranges. The cross-sectional surveys were carried-out as described in legend to S1 Fig. The frequency of seropositive subjects (Pos (%)) on each cross-sectional survey is represented below each graphic. Different number of asterisks indicate the variation on p value (*p < 0.05 to **p < 0.0001; Fisher's exact test), for significance differences between the frequency of DBP-II--Sal1 and DEKnull-2 response. (TIF)

S3 Fig. The levels of antibodies IgG response against DPBII-Sal1 and DEKnull-2 during the study period. The IgG responses were expressed as Reactivity Index (RI), with Reactivity Index (RI) > 1.0 considered positive. The individual values are represented by blue (DBP-II--Sal1) and red (DEKnull-2) open circles. Transversal lines indicate medians and interquartile ranges. The cross-sectional surveys were carried-out as described in legend to S1 Fig, with IgG

original data obtained from Pires et al., 2018 [33]. The frequency of seropositive subjects (Pos (%)) on each cross-sectional survey is represented below each graphic. Different number of asterisks indicates the variation on p value (* $p < 0.05$ to ** $p < 0.0001$; Fisher's exact test), for significance differences between the frequency of DBP-II-Sal1 and DEKnull-2 response. (TIF)

S4 Fig. Spearman correlation between IgM and IgG antibody responses against DBP-II-Sal1 (red) and DEKnull-2 (blue) of subjects with or without acute *P. vivax* infections. The correlation between IgM and IgG antibodies response were performed separately to subjects with acute *P. vivax* infections (closed triangle) and non-infected individuals (open circles) to each protein. (TIF)

S1 Table. Levels of IgM and IgG antibodies response against *P. vivax* DBP-II-proteins during the 9 years follow-up study. (DOCX)

Acknowledgments

We thank the inhabitants of Rio Pardo for enthusiastic participation in the study; the local malaria control team in Presidente Figueiredo for their logistic support; the units of Fundação Oswaldo Cruz in Manaus, AM (Fiocruz Amazonia), and Belo Horizonte, MG (Fiocruz Minas), for overall support.

Author Contributions

Conceptualization: Francis B. Ntumngia, John H. Adams, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Data curation: Camila M. P. Medeiros, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Formal analysis: Camila M. P. Medeiros, Camilla V. Pires, Letícia M. Torres, Cor J. F. Fontes, Cristiana F. A. Brito, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Funding acquisition: John H. Adams, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Investigation: Camila M. P. Medeiros, Camilla V. Pires, Letícia M. Torres, Tais N. Sousa, Francis B. Ntumngia, John H. Adams, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Methodology: Camila M. P. Medeiros, Eduardo U. M. Moreira, Camilla V. Pires, Letícia M. Torres, Luiz F. F. Guimarães, Jéssica R. S. Alves, Bárbara A. S. Lima, Cor J. F. Fontes, Helena L. Costa, Cristiana F. A. Brito, Tais N. Sousa, Francis B. Ntumngia, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Project administration: Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Resources: Cor J. F. Fontes, Cristiana F. A. Brito, Tais N. Sousa, John H. Adams, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Supervision: Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Validation: Camila M. P. Medeiros, Camilla V. Pires, Letícia M. Torres, Luiz F. F. Guimarães, Jéssica R. S. Alves, Bárbara A. S. Lima, Cor J. F. Fontes, Helena L. Costa, Tais N. Sousa, Francis B. Ntumngia, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Visualization: Camila M. P. Medeiros, Camilla V. Pires, Letícia M. Torres, Flora S. Kano.

Writing – original draft: Camila M. P. Medeiros, Camilla V. Pires, Leticia M. Torres, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Writing – review & editing: Camila M. P. Medeiros, Eduardo U. M. Moreira, Camilla V. Pires, Leticia M. Torres, Luiz F. F. Guimarães, Jéssica R. S. Alves, Bárbara A. S. Lima, Cor J. F. Fontes, Helena L. Costa, Cristiana F. A. Brito, Tais N. Sousa, Francis B. Ntumngia, John H. Adams, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

References

1. Krotoski WA. The hypnozoite and malarial relapse. *Prog Clin Parasitol.* 1989; 1:1–19. PMID: 2491691.
2. McKenzie FE, Jeffery GM, Collins WE. *Plasmodium vivax* blood-stage dynamics. *J Parasitol.* 2002; 88(3):521–35. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0521:PVBSD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0521:PVBSD]2.0.CO;2) PMID: 12099421; PubMed Central PMCID: PMC2504326.
3. Roth A, Adapa SR, Zhang M, Liao X, Saxena V, Goffe R, et al. Unraveling the *Plasmodium vivax* sporozoite transcriptional journey from mosquito vector to human host. *Sci Rep.* 2018; 8(1):12183. Epub 2018/08/15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30713-1> PMID: 30111801; PubMed Central PMCID: PMC6093925.
4. Cheng Q, Cunningham J, Gatton ML. Systematic review of sub-microscopic *P. vivax* infections: prevalence and determining factors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9(1):e3413. Epub 2015/01/08. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003413> PMID: 25569135; PubMed Central PMCID: PMC4288718.
5. Moreira CM, Abo-Shehadeh M, Price RN, Drakeley CJ. A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. *Malar J.* 2015; 14:360. Epub 2015/09/22. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0884-z> PMID: 26390924; PubMed Central PMCID: PMC4578340.
6. Battle KE, Lucas TCD, Nguyen M, Howes RE, Nandi AK, Twohig KA, et al. Mapping the global endemicity and clinical burden of *Plasmodium vivax*, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. *Lancet.* 2019; 394(10195):332–43. Epub 2019/06/19. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31096-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31096-7) PMID: 31229233; PubMed Central PMCID: PMC6675736.
7. Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. *Adv Parasitol.* 2013; 81:77–131. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407826-0.00003-5> PMID: 23384622.
8. Adams JH, Mueller I. The Biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017; 7(9). Epub 2017/09/01. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025585> PMID: 28490540; PubMed Central PMCID: PMC5580510.
9. Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med.* 1976; 295(6):302–4. <https://doi.org/10.1056/NEJM197608052950602> PMID: 778616.
10. Adams JH, Hudson DE, Torii M, Ward GE, Wellems TE, Aikawa M, et al. The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell.* 1990; 63(1):141–53. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90295-p](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90295-p) PMID: 2170017.
11. Ceravolo IP, Sanchez BA, Sousa TN, Guerra BM, Soares IS, Braga EM, et al. Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. *Clin Exp Immunol.* 2009; 156(3):502–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03931.x> PMID: 19438604; PubMed Central PMCID: PMC2691980.
12. Chootong P, Ntumngia FB, VanBuskirk KM, Xainli J, Cole-Tobian JL, Campbell CO, et al. Mapping epitopes of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. *Infect Immun.* 2010; 78(3):1089–95. Epub 2009/12/14. <https://doi.org/10.1128/IAI.01036-09> PMID: 20008533; PubMed Central PMCID: PMC2825952.
13. Cole-Tobian JL, Cortés A, Baisor M, Kastens W, Xainli J, Bockarie M, et al. Age-acquired immunity to a *Plasmodium vivax* invasion ligand, the duffy binding protein. *J Infect Dis.* 2002; 186(4):531–9. Epub 2002/07/26. <https://doi.org/10.1086/341776> PMID: 12195381.
14. Chen E, Salinas ND, Huang Y, Ntumngia F, Plasencia MD, Gross ML, et al. Broadly neutralizing epitopes in the *Plasmodium vivax* vaccine candidate Duffy Binding Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113(22):6277–82. Epub 2016/05/18. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600488113> PMID: 27194724; PubMed Central PMCID: PMC4896725.
15. Ntumngia FB, Schloegel J, Barnes SJ, McHenry AM, Singh S, King CL, et al. Conserved and variant epitopes of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein as targets of inhibitory monoclonal antibodies. *Infect Immun.* 2012; 80(3):1203–8. Epub 2012/01/03. <https://doi.org/10.1128/IAI.05924-11> PMID: 22215740; PubMed Central PMCID: PMC3294652.

16. Ntumngia FB, Adams JH. Design and immunogenicity of a novel synthetic antigen based on the ligand domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein. *Clin Vaccine Immunol*. 2012; 19(1):30–6. Epub 2011/11/23. <https://doi.org/10.1128/CVI.05466-11> PMID: 22116684; PubMed Central PMCID: PMC3255949.
17. Urusova D, Carias L, Huang Y, Nicolette VC, Popovici J, Roesch C, et al. Structural basis for neutralization of *Plasmodium vivax* by naturally acquired human antibodies that target DBP. *Nat Microbiol*. 2019; 4(9):1486–96. Epub 2019/05/27. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0461-2> PMID: 31133752; PubMed Central PMCID: PMC6707876.
18. George MT, Schloegel JL, Ntumngia FB, Barnes SJ, King CL, Casey JL, et al. Identification of an Immunogenic Broadly Inhibitory Surface Epitope of the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein Ligand Domain. *mSphere*. 2019; 4(3). Epub 2019/05/15. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00194-19> PMID: 31092602; PubMed Central PMCID: PMC6520440.
19. Carias LL, Dechavanne S, Nicolette VC, Sreng S, Suon S, Amaratunga C, et al. Identification and Characterization of Functional Human Monoclonal Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy-Binding Protein. *J Immunol*. 2019; 202(9):2648–60. Epub 2019/04/03. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801631> PMID: 30944159; PubMed Central PMCID: PMC6764764.
20. King CL, Michon P, Shakri AR, Marcotty A, Stanisic D, Zimmerman PA, et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(24):8363–8. Epub 2008/06/03. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800371105> PMID: 18523022; PubMed Central PMCID: PMC2448842.
21. Nicolette VC, Frischmann S, Barbosa S, King CL, Ferreira MU. Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein and Clinical Immunity to Malaria in Rural Amazonians. *J Infect Dis*. 2016; 214(10):1539–46. Epub 2016/08/30. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw407> PMID: 27578850; PubMed Central PMCID: PMC5091372.
22. Ntumngia FB, Pires CV, Barnes SJ, George MT, Thomson-Luque R, Kano FS, et al. An engineered vaccine of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein enhances induction of broadly neutralizing antibodies. *Sci Rep*. 2017; 7(1):13779. Epub 2017/10/23. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13891-2> PMID: 29062081; PubMed Central PMCID: PMC5653783.
23. COHEN S, MCGREGOR IA, CARRINGTON S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*. 1961; 192:733–7. <https://doi.org/10.1038/192733a0> PMID: 13880318.
24. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1991; 45(3):297–308. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.45.297> PMID: 1928564.
25. Stone SL, Lund FE. IgM Memory Cells: First Responders in Malaria. *Immunity*. 2016; 45(2):235–7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.005> PMID: 27533010.
26. Pleass RJ, Moore SC, Stevenson L, Hviid L. Immunoglobulin M: Restraint of Inflammation and Mediator of Immune Evasion by *Plasmodium falciparum* Malaria. *Trends Parasitol*. 2016; 32(2):108–19. Epub 2015/11/18. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.09.007> PMID: 26597020.
27. Krishnamurthy AT, Thouvenel CD, Portugal S, Keitany GJ, Kim KS, Holder A, et al. Somatic Hypermutation of Plasmodium-Specific IgM(+) Memory B Cells Are Rapid, Plastic, Early Responders upon Malaria Rechallenge. *Immunity*. 2016; 45(2):402–14. Epub 2016/07/26. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.014> PMID: 27473412; PubMed Central PMCID: PMC5118370.
28. Couper KN, Phillips RS, Brombacher F, Alexander J. Parasite-specific IgM plays a significant role in the protective immune response to asexual erythrocytic stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Parasite Immunol*. 2005; 27(5):171–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00760.x> PMID: 15987340.
29. Borges da Silva H, Machado de Salles É, Lima-Mauro EF, Sardinha LR, Álvarez JM, D'Império Lima MR. CD28 deficiency leads to accumulation of germinal-center independent IgM+ experienced B cells and to production of protective IgM during experimental malaria. *PLoS One*. 2018; 13(8):e0202522. Epub 2018/08/27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202522> PMID: 30148845; PubMed Central PMCID: PMC6110469.
30. Arama C, Skinner J, Doumtable D, Portugal S, Tran TM, Jain A, et al. Genetic Resistance to Malaria Is Associated With Greater Enhancement of Immunoglobulin (Ig)M Than IgG Responses to a Broad Array of *Plasmodium falciparum* Antigens. *Open Forum Infect Dis*. 2015; 2(3):ofv118. Epub 2015/08/26. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv118> PMID: 26361633; PubMed Central PMCID: PMC4564391.
31. Boyle MJ, Chan JA, Handayani I, Reiling L, Feng G, Hilton A, et al. IgM in human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Sci Adv*. 2019; 5(9):eaax4489. Epub 2019/09/25. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax4489> PMID: 31579826; PubMed Central PMCID: PMC6760923.
32. Boonyaratankornkit J, Taylor JJ. Immunoglobulin M, more than just an early responder to malaria. *Immunol Cell Biol*. 2019; 97(9):771–3. <https://doi.org/10.1111/imcb.12292> PMID: 31603585.

33. Pires CV, Alves JRS, Lima BAS, Paula RB, Costa HL, Torres LM, et al. Blood-stage *Plasmodium vivax* antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. *PLoS One*. 2018; 13(11):e0207244. Epub 2018/11/12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207244> PMID: 30419071; PubMed Central PMCID: PMC6231651.
34. Harte PG, Cooke A, Playfair JH. Specific monoclonal IgM is a potent adjuvant in murine malaria vaccination. *Nature*. 1983; 302(5905):256–8. <https://doi.org/10.1038/302256a0> PMID: 6835362.
35. Diamond MS, Sitati EM, Friend LD, Higgs S, Shrestha B, Engle M. A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection. *J Exp Med*. 2003; 198(12):1853–62. Epub 2003/12/08. <https://doi.org/10.1084/jem.20031223> PMID: 14662909; PubMed Central PMCID: PMC2194144.
36. Boes M, Esau C, Fischer MB, Schmidt T, Carroll M, Chen J. Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. *J Immunol*. 1998; 160(10):4776–87. PMID: 9590224.
37. Kano FS, Sanchez BA, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, et al. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Health*. 2012; 17(8):989–1000. Epub 2012/05/30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2012.03016.x> PMID: 22643072.
38. Kano FS, Souza-Silva FA, Torres LM, Lima BA, Sousa TN, Alves JR, et al. The Presence, Persistence and Functional Properties of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(12):e0005177. Epub 2016/12/13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005177> PMID: 27959918; PubMed Central PMCID: PMC5154503.
39. Souza-Silva FA, Torres LM, Santos-Alves JR, Tang ML, Sanchez BA, Sousa TN, et al. Duffy antigen receptor for chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-duffy binding protein II (DBPII) immunity. *PLoS One*. 2014; 9(4):e93782. Epub 2014/04/07. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093782> PMID: 24710306; PubMed Central PMCID: PMC3977910.
40. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 80(3):452–9. PMID: 19270298.
41. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2009.
42. Amaral LC, Robertella DR, Guimarães LFF, Limongi JE, Fontes CJF, Pereira DB, et al. Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections. *Malar J*. 2019; 18(1):154. Epub 2019/04/30. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2781-3> PMID: 31039781; PubMed Central PMCID: PMC6492410.
43. Fang XD, Kaslow DC, Adams JH, Miller LH. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol Biochem Parasitol*. 1991; 44(1):125–32. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90228-x](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90228-x) PMID: 1849231.
44. Ceravolo IP, Souza-Silva FA, Fontes CJ, Braga EM, Madureira AP, Krettli AU, et al. Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scand J Immunol*. 2008; 67(3):270–8. Epub 2008/01/22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.02059.x> PMID: 18226014.
45. Patgaonkar M, Herbert F, Powale K, Gandhe P, Gogtay N, Thatte U, et al. Vivax infection alters peripheral B-cell profile and induces persistent serum IgM. *Parasite Immunol*. 2018; 40(10):e12580. Epub 2018/09/11. <https://doi.org/10.1111/pim.12580> PMID: 30102786.
46. Bohannon C, Powers R, Satyabhama L, Cui A, Tipton C, Michaeli M, et al. Long-lived antigen-induced IgM plasma cells demonstrate somatic mutations and contribute to long-term protection. *Nat Commun*. 2016; 7:11826. Epub 2016/06/07. <https://doi.org/10.1038/ncomms11826> PMID: 27270306; PubMed Central PMCID: PMC4899631.
47. Eisen HN. Affinity enhancement of antibodies: how low-affinity antibodies produced early in immune responses are followed by high-affinity antibodies later and in memory B-cell responses. *Cancer Immunol Res*. 2014; 2(5):381–92. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0029> PMID: 24795350.
48. Lopes SC, Albrecht L, Carvalho BO, Siqueira AM, Thomson-Luque R, Nogueira PA, et al. Paucity of *Plasmodium vivax* mature schizonts in peripheral blood is associated with their increased cytoadhesive potential. *J Infect Dis*. 2014; 209(9):1403–7. Epub 2014/01/09. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu018> PMID: 24415786.
49. Barber BE, William T, Grigg MJ, Parameswaran U, Piera KA, Price RN, et al. Parasite biomass-related inflammation, endothelial activation, microvascular dysfunction and disease severity in vivax malaria. *PLoS Pathog*. 2015; 11(1):e1004558. Epub 2015/01/08. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004558> PMID: 25569250; PubMed Central PMCID: PMC4287532.
50. Obaldia N, Meibalan E, Sa JM, Ma S, Clark MA, Mejia P, et al. Bone Marrow Is a Major Parasite Reservoir in *Plasmodium vivax* Infection. *MBio*. 2018; 9(3). Epub 2018/05/08. <https://doi.org/10.1128/mBio.00625-18> PMID: 29739900; PubMed Central PMCID: PMC5941073.

51. Winter O, Dame C, Jundt F, Hiepe F. Pathogenic long-lived plasma cells and their survival niches in autoimmunity, malignancy, and allergy. *J Immunol*. 2012; 189(11):5105–11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202317> PMID: 23169863.
52. Papillion AM, Kenderes KJ, Yates JL, Winslow GM. Early derivation of IgM memory cells and bone marrow plasmablasts. *PLoS One*. 2017; 12(6):e0178853. Epub 2017/06/02. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178853> PMID: 28575114; PubMed Central PMCID: PMC5456393.
53. Stanisic DI, Fowkes FJ, Koinari M, Javati S, Lin E, Kiniboro B, et al. Acquisition of antibodies against *Plasmodium falciparum* merozoites and malaria immunity in young children and the influence of age, force of infection, and magnitude of response. *Infect Immun*. 2015; 83(2):646–60. Epub 2014/11/24. <https://doi.org/10.1128/IAI.02398-14> PMID: 25422270; PubMed Central PMCID: PMC4294228.
54. Mertens F, Levitus G, Camargo LM, Ferreira MU, Dutra AP, Del Portillo HA. Longitudinal study of naturally acquired humoral immune responses against the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in patients from Rondonia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1993; 49(3):383–92. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.49.383> PMID: 8372960.
55. Soares IS, da Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 60(3):357–63. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.357> PMID: 10466961.
56. Tomaz FM, da Cruz Furini AA, Capobianco MP, Póvoa MM, Trindade PC, Fraga VD, et al. Humoral immune responses against the malaria vaccine candidate antigen *Plasmodium vivax* AMA-1 and IL-4 gene polymorphisms in individuals living in an endemic area of the Brazilian Amazon. *Cytokine*. 2015; 74(2):273–8. Epub 2015/04/25. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.03.020> PMID: 25922277.
57. Cassiano GC, Furini AA, Capobianco MP, Storti-Melo LM, Almeida ME, Barbosa DR, et al. Immunogenetic markers associated with a naturally acquired humoral immune response against an N-terminal antigen of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP-1). *Malar J*. 2016; 15:306. Epub 2016/06/03. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1350-2> PMID: 27255376; PubMed Central PMCID: PMC4891883.
58. Sousa TN, Tarazona-Santos EM, Wilson DJ, Madureira AP, Falcão PR, Fontes CJ, et al. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian *Plasmodium vivax* populations. *Malar J*. 2010; 9:334. Epub 2010/11/22. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-334> PMID: 21092207; PubMed Central PMCID: PMC3003673.
59. Nóbrega de Sousa T, Carvalho LH, Alves de Brito CF. Worldwide genetic variability of the Duffy binding protein: insights into *Plasmodium vivax* vaccine development. *PLoS One*. 2011; 6(8):e22944. Epub 2011/08/02. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022944> PMID: 21829672; PubMed Central PMCID: PMC3149059.