

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: IMUNOLOGIA E
DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS/GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Cynthia Magalhães Rodolphi

Perfil de resposta de anticorpos contra peptídeos lineares representando proteínas de fase exoeritrocítica (CeTOS e TRAP) e eritrocítica (CyRPA) de *Plasmodium vivax* durante a fase aguda e convalescente da infecção malárica

Juiz de Fora

2024

Cynthia Magalhães Rodolphi

Perfil de resposta de anticorpos contra peptídeos lineares representando proteínas de fase exoeritrocítica (CelTOS e TRAP) e eritrocítica (CyRPA) de *Plasmodium vivax* durante a fase aguda e convalescente da infecção malárica

Dissertação de mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Prof. Dra. Kézia Katiani Gorza Scopel

Coorientador: Prof. Dr. Josué da Costa Lima-Junior

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rodolphi, Cinthia Magalhães.

Perfil de resposta de anticorpos contra peptídeos lineares representando proteínas de fase exoeritrocítica (CeITOS e TRAP) e eritrocítica (CyRPA) de *Plasmodium vivax* durante a fase aguda e convalescente da infecção malárica. / Cinthia Magalhães Rodolphi. -- 2024.

88 f. : il.

Orientadora: Kézia Katiani Gorza Scopel

Coorientador: Josué da Costa Lima-Junior

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2024.

1. Malaria. 2. Resposta humoral. 3. Peptídeos. I. Scopel, Kézia Katiani Gorza, orient. II. Lima-Junior, Josué da Costa, coorient. III. Título.

Cinthia Magalhães Rodolphi

**Título: Perfil de resposta de anticorpos
contra peptídeos lineares representando proteínas de fase exoeritrocítica (CeTOS e TRAP)
e eritrocítica (CyRPA) de *Plasmodium vivax* durante a
fase aguda e convalescente da infecção malárica,**

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós
Graduação em
Ciências
Biológicas da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Imunologia/DIP

Aprovada em 24 de maio de 2024

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Kézia Katiani Gorza Scopel- Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Paulo Renato Rivas Totino

IOC - FIOCRUZ

Profa. Dra. Priscila Faria Pinto

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 30/04/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Kezia Katiani Gorza Scopel, Professor(a)**, em 27/05/2024, às 08:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscila de Faria Pinto, Professor(a)**, em 27/05/2024, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **PAULO RENATO RIVAS TOTINO, Usuário Externo**, em 16/07/2024, às 17:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1794297** e o código CRC **388483AC**.

Dedico este trabalho a todos os voluntários de
Nova Califórnia, Acrelândia e Plácido de Castro.

AGRADECIMENTOS

Com o fim de mais esse ciclo, olho para tudo o que foi construído com bastante gratidão! Não foi um caminho fácil, mas muitas pessoas estiveram comigo e se hoje encerro essa etapa, foi graças ao carinho de cada um dos envolvidos.

Primeiramente agradeço à Deus, e a Nossa Senhora Aparecida por iluminarem meu caminho até aqui com bençãos e graças.

Agradeço imensamente aos voluntários das cidades de Nova Califórnia, Acrelândia e Plácido de Castro. Aos membros da banca por aceitarem o convite. A Dra. Daniela Chaves Renhe pela paciência e carinho nos meus primeiros ELISAs; aos meus amigos de laboratório na UFJF por toda ajuda e carinho; em especial a Carolina pela amizade, as conversas, as brincadeiras, por sempre estar pronta a me ajudar mesmo aos finais de semana e toda a cumplicidade, agradecimento estendido também a seus familiares que por muitas vezes foram família também para mim.

Agradeço aos meus amigos de laboratório no IOC/FIOCRUZ por me receberem de braços abertos: a Ada por estar comigo no meu primeiro ELISA no Rio e pelas conversas, risadas e cafés; a Rafaela pelo carinho e pelas boas risadas; a Ana Luiza e a Isabela Soares por toda cumplicidade, ajuda, amizade e rodízios de café da tarde, estar com vocês duas iluminava os dias mais tristes e sou muito grata por todo o tempo que passamos juntas.

Agradeço aos pesquisadores do XXVI Seminário Laveran e Deane sobre Malária por todas as contribuições feitas ao meu projeto e agradeço também aos amigos que fiz por lá: Caio, Jady, Janaína, Lídia, Nyanne, Rafael e Renato, obrigada pelo tempo de qualidade no seminário e pelo carinho e amizade depois dele, vocês são pessoas que vou levar com muito carinho no coração.

Agradeço aos amigos que fiz em Juiz de Fora por tantos anos de amizade e pelo apoio durante todo o mestrado: a Hanna, Stephane e Thais por estarem comigo desde a graduação, carregando vocês no coração aonde eu vou e agradeço imensamente e por sempre estarem comigo nos momentos bons e nos nem tão bons assim; ao meu amigo Edimar por também estar comigo nos altos e baixos e mesmo longe se fazer presente.

Aos meus amigos de Bom Jesus do Itabapoana minha terra natal: Israel, Joyce, Kíssila, Mayara e Yasmim e, por sempre me apoiarem e me proporcionarem os melhores momentos e risadas. A Isabella Lauria, Júlia, Mariana, Stella e Tereza, minhas amigas de infância, por serem meu porto seguro nessa jornada e por não me deixarem vacilar nem um segundo.

Aos meus tios Reinaldo e Fátima por me acolherem no Rio com muito carinho, a todos os primos que torceram por mim, em especial a Dinda Luiza, Juliana, Davi e Silvío por todos os momentos prazerosos, os conselhos e todo o carinho durante tempo em que passei no Rio. Agradeço também ao meu namorado Filipe por toda a cumplicidade e não medir esforços em me auxiliar nas minhas idas e voltas ao Rio.

Agradeço imensamente a minha família, meu bem mais precioso. Muito obrigada ao meu pai Antônio, a minha Dindinha Cidinha e aos meus avós Conceição e João por não medirem esforços para que eu realize todos os meus sonhos e chegasse a lugares que vocês não conseguiram. Eu não estaria aqui se não fosse pelo amor de vocês, essa conquista é nossa! A minha mãe Daiana, a meus irmãos Gabriel e Heitor que são bençãos na minha vida, e ao meu padrasto Leandro agradeço a torcida, carinho e orações.

E por último, e mais importante, aos meus orientadores Kézia e Josué. Kézia, com certeza não teria feito metade disso sem a sua confiança na minha capacidade, eu não tenho palavras para agradecer por todas as oportunidades que você me deu de crescer como pesquisadora e como pessoa, agradeço profundamente todo o carinho, todas as orientações, conselhos e por me acalmar em todos os momentos que eu achava que não era capaz, você me mostrou que eu posso e posso muito, muito obrigada por isso. Josué, você foi luz para mim, obrigada por me receber com tanto carinho no seu laboratório e me incluir como parte dele, também cresci muito no tempo que eu estive aí, como pessoa e pesquisadora, muito obrigada por todos os conselhos e oportunidades. Foi uma honra trabalhar com pesquisadores tão brilhantes como vocês dois, não poderia ter pedido por uma dupla melhor! Obrigada aos professores e técnicos do PPGCBIO; a CAPES, CNPq, FAPEMIG e FAPERJ pelo financiamento e que sigamos nas palavras do brilhante Oswaldo Cruz: “Fé eterna na ciência”!

RESUMO

A malária é um problema de saúde pública a nível mundial que acomete principalmente crianças e pessoas em vulnerabilidade social. No Brasil a doença é endêmica na região Norte, com *Plasmodium vivax* sendo a espécie predominante com mais de 80% dos casos confirmados anualmente. O elevado número de casos clínicos, a crescente resistência dos parasitos aos antimaláricos usuais e a ausência de uma vacina eficaz contra a malária, têm contribuído para o insucesso nos programas de eliminação da doença no mundo. Existem apenas duas vacinas contra a malária licenciadas, porém ambas são direcionadas exclusivamente a infecções por *Plasmodium falciparum*, espécie que detém a grande maioria dos estudos sobre a doença, com poucos trabalhos avaliando a complexidade da resposta imune em *P. vivax*, sendo assim, o entendimento da resposta humoral direcionada a distintas proteínas dos plasmódios em regiões de baixa endemicidade ainda é necessário para nortear o desenvolvimento de vacinas nessas regiões, especialmente no Brasil. Com base nisso, o presente trabalho tem por objetivo mapear o perfil de resposta de anticorpos em indivíduos na fase aguda (D0) e convalescença (D30 e D180 após a infecção) da malária vivax. Para tal utilizou-se peptídeos sintéticos que representam porções lineares das proteínas CelTOS e TRAP de fase exoeritrocítica e CyRPA de fase eritrocítica de *P. vivax*, candidatas vacinais em potencial. O ELISA indireto com o soro de pacientes provenientes da região endêmica brasileira, infectados ou não, e de indivíduos não expostos foi o método utilizado para a determinação da positividade e magnitude dos índices de reatividade dos anticorpos IgM, IgG e suas subclasses. O índice de reatividade também foi utilizado para avaliar a dinâmica de resposta nos dias 0 e 30; 0 e 180; e 0, 30 e 180 pós infecção para IgG e para a correlação com parâmetros clínicos epidemiológicos durante a fase aguda para IgG e IgM. Os resultados obtidos mostram que a população estudada mostra frequência e magnitude para todos os peptídeos e anticorpos nos diferentes dias de coleta. Para IgM, uma maior frequência de respondedores foi associada ao peptídeo de fase eritrocítica durante a fase aguda. Para IgG, observa-se que uma grande parcela da população estudada responde as proteínas nos diferentes dias de coleta, com destaque para os peptídeos de fase exoeritrocítica onde mais de 40% respondem em todos os pontos. Já durante a análise da estabilidade de IgG ao longo dos diferentes pontos do segmento, observa-se que para todos os peptídeos, os anticorpos se mantêm estáveis até 180 dias após a infecção. Entre as subclasses, IgG2, apesar de não citofílica, foi a subclasse que apresentou a maioria das frequências nos diferentes pontos de coleta, enquanto para as citofílicas, IgG3 possuiu maior destaque. Fatores de exposição da doença não mostraram correlações significantes tanto com IgG quanto com IgM. Conclui-se,

portanto, que os epítomos imunodominantes aqui apresentados são naturalmente imunogênicos na população estudada, apresentando frequência de respondedores e magnitude de índice de reatividade, tanto para IgG total quanto para suas subclasses, com a resposta podendo se manter até 180 dias pós infecção.

Palavras-chave: malária, resposta humoral, peptídeos, PvCeITOS, PvTRAP, PvCyRPA.

ABSTRACT

Malaria is a global public health problem that mainly affects children and socially vulnerable people. In Brazil, the disease is endemic in the North region, with *Plasmodium vivax* being the predominant species with more than 80% of cases confirmed annually. The high number of clinical cases, the increasing resistance of parasites to the usual antimalarials, and the absence of an effective vaccine against malaria have contributed to the failure of programs to eliminate the disease around the world. There are only two licensed malaria vaccines, but both are aimed exclusively at infections by *Plasmodium falciparum*, the species that holds the great majority of studies on the disease, with only a few studies evaluating the complexity of the immune response in *P. vivax*, therefore, the understanding of the humoral response directed to different plasmodia proteins in regions of low endemicity is still necessary to guide the development of vaccines in these regions, especially in Brazil. Based on this, the present work aims to map the antibody response profile in individuals in the acute phase (D0) and convalescence (D30 and D180 after infection) of vivax malaria. To this end, synthetic peptides were used that represent linear portions of the proteins CelTOS and TRAP from the exoerythrocytic phase and CyRPA from the erythrocytic phase of *P. vivax*, all of them are potential vaccine candidates. The indirect ELISA with serum from patients from the Brazilian endemic region, infected or not, and from unexposed individuals was the method used to determine the positivity and magnitude of the reactivity indexes of IgM, IgG antibodies, and their subclasses. The reactivity index was also used to evaluate the response dynamics on days 0 and 30; 0 and 180; and 0, 30, and 180 post-infection for IgG and for correlation with clinical epidemiological parameters during the acute phase for IgG and IgM. The results obtained show that the studied population shows frequency and magnitude for all peptides and antibodies on different collection days. For IgM, a higher frequency of responders was associated with the erythrocytic phase peptide during the acute phase. For IgG, it was observed that a large portion of the studied population responds to proteins on different collection days, with emphasis on peptides from the exoerythrocytic phase where more than 40% respond at all points. During the analysis of IgG stability throughout the different points of the segment, it was observed that for all peptides, the antibodies remained stable up to 180 days after infection. Among the subclasses, IgG2, despite not being cytophilic, was the subclass that presented the most frequencies at the different collection points, while for the cytophilic ones, IgG3 was more prominent. Disease exposure factors did not show significant correlations with either IgG or IgM. We can conclude that the immunodominant epitopes presented here are naturally

immunogenic in the studied population, presenting a frequency of responders and magnitude of reactivity index, both for total IgG and its subclasses, with the response being able to be maintained up to 180 days post-infection.

Keywords: malaria, humoral response, peptides, PvTRAP, PvCelTOS, PvCyRPA

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | – Fóssil do mosquito <i>Culex malariager</i> , descoberto na República Dominicana preservado em âmbar e infectado com o <i>Plasmodium dominicana</i> | 18 |
| Figura 2 | – Estratificação dos municípios segundo a IPA..... | 24 |
| Figura 3 | – Ilustração esquemática do ciclo biológico de <i>Plasmodium spp.</i> | 28 |
| Figura 4 | – Representação esquemática do link entre a imunidade inata e adaptativa na fase eritrocítica da malária..... | 32 |
| Figura 5 | – Representação esquemática da estrutura das classes de anticorpos humanos.. | 34 |
| Figura 6 | – Modelo do mecanismo de passagem celular de CelTOS..... | 39 |
| Figura 7 | – Modelo do mecanismo de ativação da TRAP..... | 42 |
| Figura 8 | – Esquema representando a invasão do merozoíto na hemácia e o papel do complexo multiproteico..... | 44 |
| Figura 9 | – (Figure 1) Frequência de respondedores e índice de reatividade de IgG total contra PvCelTOS ^(I133-G147) , PvTRAP ^(P344-G374) e PvCyRPA ^(T289-G307) na fase aguda da doença por <i>P. vivax</i> e nos indivíduos CH..... | 52 |
| Figura 10 | – (Figure 2) Frequência de respondedores e índice de reatividade de IgG total contra PvCelTOS ^(I133-G147) , PvTRAP ^(P344-G374) e PvCyRPA ^(T289-G307) na fase convalescente da doença por <i>P. vivax</i> | 52 |
| Figura 11 | – (Figure 3) Frequência de respondedores e índice de reatividade de IgG1, IgG2 e IgG3 contra PvCelTOS ^(I133-G147) , PvTRAP ^(P344-G374) e PvCyRPA ^(T289-G307) na fase aguda e convalescente da doença por <i>P. vivax</i> | 54 |
| Figura 12 | – (Figure 4) Dinâmica da resposta de anticorpos durante a fase aguda e 30 dias pós infecção da doença por <i>P. vivax</i> para PvCelTOS ^(I133-G147) , PvTRAP ^(P344-G374) e PvCyRPA ^(T289-G307) | 56 |
| Figura 13 | – (Figure 5) Dinâmica da resposta de anticorpos durante a fase aguda e 180 dias pós infecção da doença por <i>P. vivax</i> para PvCelTOS ^(I133-G147) , PvTRAP ^(P344-G374) e PvCyRPA ^(T289-G307) | 56 |
| Figura 14 | – (Figure 6) Dinâmica da resposta de anticorpos durante a fase aguda e convalescente (30 e 180 dias pós infecção) da doença por <i>P. vivax</i> para PvCelTOS ^(I133-G147) , PvTRAP ^(P344-G374) e PvCyRPA ^(T289-G307) | 57 |
| Figura 15 | – (Figure A2) IR dos indivíduos primoinfectados e indivíduos com mais de 1 malária prévia para PvCelTOS ^(I133-G147) , PvTRAP ^(P344-G374) e PvCyRPA ^(T289-G307) na fase aguda de <i>P. vivax</i> para IgM..... | 63 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | – Correlação entre o índice de reatividade da fase aguda dos antígenos PvCelTOS ^(I133-G147) , PvTRAP ^(P344-G374) e PvCyRPA ^(T289-G307) com o número de malárias prévias..... | 57 |
| Tabela 2 | – Correlação entre o índice de reatividade da fase aguda dos antígenos PvCelTOS ^(I133-G147) , PvTRAP ^(P344-G374) e PvCyRPA ^(T289-G307) com o tempo de exposição (anos)..... | 58 |
| Tabela 3 | – Correlação entre o índice de reatividade da fase aguda dos antígenos PvCelTOS ^(I133-G147) , PvTRAP ^(P344-G374) e PvCyRPA ^(T289-G307) com a parasitemia..... | 58 |
| Tabela 4 | – (Table A1) Perfil dos pacientes..... | 62 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|--|
| a.C | Antes de Cristo |
| AMA-1 | Antígeno 1 de Membrana Apical |
| APCs | Células Apresentadoras de Antígeno |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| BSG | Basigina Receptora de Eritrócitos |
| CD31 | <i>Cluster</i> de Diferenciação 31 |
| CD36 | <i>Cluster</i> de Diferenciação 36 |
| CeTOS | Proteína de Passagem Celular de Oocinetos e Esporozoítos |
| CH | Cohabitantes |
| CSA | Sulfato de Condroitina A |
| CSP | Proteína Circumsporozoíta |
| CyRPA | Antígeno Protetor Rico em Cisteína |
| d.C | Depois de Cristo |
| DDT | Dicloro-Difenil-Tricloroetano |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| EBA | Antígenos de Ligação Eritrocítica |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática |
| HPV | Vírus do Papiloma Humano |
| HSPG | Proteoglicanos de Sulfato de Heparano |
| ICAM-1 | Molécula 1 de Adesão Intracelular |
| IFN- γ | Interferon- γ |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgG1 | Imunoglobulina G 1 |
| IgG2 | Imunoglobulina G 2 |
| IgG3 | Imunoglobulina G 3 |
| IgG4 | Imunoglobulina G 4 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IgM | Imunoglobulina M |
| INA | Imunidade Naturalmente Adquirida |
| IPA | Índice Parasitário Anual |
| IR | Índice de Reatividade |

| | |
|--------------|---|
| kDa | Kilodalton |
| MIDAS | Sítios de Adesão Dependentes de Íon |
| MSP | Proteína de Superfície de Merozoíto |
| NCAM | Molécula de Adesão Celular Neural |
| NEC | Controle não exposto |
| NK | <i>Natural Killer</i> |
| NO | Óxido Nítrico |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OPD | O-fenilenodiamina dicloridato |
| PBS | Tampão salino-fosfato |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PvAMA-1 | Antígeno 1 de Membrana Apical de <i>Plasmodium vivax</i> |
| PvCelTOS | Proteína de Passagem Celular de Oocinetos e Esporozoítos de <i>Plasmodium vivax</i> |
| PvCyRPA | Antígeno Protetor Rico em Cisteína de <i>Plasmodium vivax</i> |
| PvMSP9 | Proteína 9 de Superfície de Merozoíto de <i>Plasmodium vivax</i> |
| PvTRAP | Proteína Adesiva Relacionada a Trombospondina de <i>Plasmodium vivax</i> |
| RBL | Proteína Semelhante a Proteína de Ligação de Reticulócitos |
| RH5 | Proteína Homóloga 5 de Ligação de Reticulócitos |
| RI | <i>Reactivity Index</i> |
| Ripr | Proteína de Interação com RH5 |
| RON-2 | Proteína de Pescoço de Roptria 2 |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| TGF- β | Fator de Crescimento Tumoral- β |
| TMB | 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| TNF α | Fator de Necrose Tumoral α |
| TRAP | Proteína Adesiva Relacionada a Trombospondina |

SUMÁRIO

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 1.1 | HISTÓRICO DA MALÁRIA NO MUNDO..... | 18 |
| 1.2 | EPIDEMIOLOGIA..... | 22 |
| 1.3 | CICLO BIOLÓGICO..... | 24 |
| 1.4 | MALÁRIA E SEUS AGRAVOS..... | 29 |
| 1.5 | CONTROLE DA MALÁRIA..... | 30 |
| 1.6 | IMUNIDADE NA MALÁRIA..... | 30 |
| 1.7 | DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA MALÁRIA..... | 35 |
| 1.8 | O USO DE PEPTÍDEOS PARA O ESTUDO DE PERFIS DE RESPOSTA IMUNE HUMORAL NA MALÁRIA..... | 37 |
| 1.9 | ANTÍGENOS DE FASE EXOERITROCÍTICA PROMISSORES NA INDUÇÃO DA PROTEÇÃO CONTRA MALÁRIA VIVAX..... | 38 |
| 1.9.1 | Proteína de Passagem Celular de Oocinetos e Esporozoítos (CelTOS)..... | 38 |
| 1.9.2 | Proteína Adesiva Relacionada a Trombospondina (TRAP)..... | 40 |
| 1.10 | ANTÍGENOS DE FASE ERITROCÍTICA PROMISSORES NA INDUÇÃO DA PROTEÇÃO CONTRA MALÁRIA VIVAX..... | 42 |
| 1.10.1 | Antígeno Protetor Rico em Cisteína (CyRPA)..... | 42 |
| 2 | JUSTIFICATIVA..... | 46 |
| 3 | OBJETIVO GERAL..... | 47 |
| 3.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 47 |
| 4 | METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 48 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 68 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 69 |
| | ANEXO A – Artigo de coautoria já publicado..... | 86 |
| | ANEXO B – Artigo de coautoria submetido 01..... | 87 |
| | ANEXO C – Artigo de coautoria submetido 02..... | 88 |

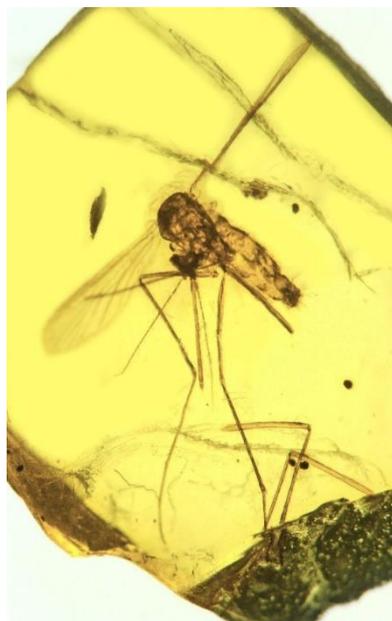
1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DA MALÁRIA DO MUNDO

Configurada como um grave problema de saúde pública mundial, a malária, doença vetorial causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, assola o mundo há milhares de anos. A evidência mais antiga sobre a doença foi encontrada no fóssil de um mosquito que continha oocistos de um ancestral de *Plasmodium* preservados em âmbar, que datava entre 15-20 milhões de anos e foi encontrado na República Dominicana (BOUALAM et. al., 2021) (Figura 1).

Acredita-se que para a maioria das espécies de *Plasmodium*, sua coevolução com primatas não-humanos aconteceu na África, com *P. falciparum* surgindo de ancestrais que infectavam gorilas há mais de 10,000 anos atrás enquanto *P. vivax* pode ter surgido há mais de 400,000 anos antes em diferentes espécies de macacos (BOUALAM et. al., 2021; SHARP, PLENDERLEITH e HAHN, 2020; LIU et. al., 2014). Já *P. knowlesi* provavelmente surgiu no Sudeste da Ásia entre 478,000-98,000 anos atrás em macacos que habitavam essa mesma área (LEE et. al., 2011), enquanto para *P. malariae* e *P. ovale* não se sabe ao certo sobre suas origens. A coevolução de *Plasmodium spp.* com os primeiros seres humanos fez com que a doença se espalhasse da África para o resto do mundo devido às migrações das populações pré-históricas (COX, 2002).

Figura 1 – Fóssil do mosquito *Culex malariager*, descoberto na República Dominicana preservado em âmbar e infectado com o *Plasmodium dominicana*



Fonte: George Poinar Jr., Oregon State University, (2013).

Documentos chineses de 2,700 a.C já descrevem a ocorrência de febre paroxística, hoje inserida nos sintomas clássicos da malária (CARTER e MENDIS, 2002; COX, 2010). Além disso, tábuas de argila da Mesopotâmia de 2,000 a.C, papiros egípcios de 1,570 a.C e textos hindus que remontam do século VI a.C já foram vistos também contendo possíveis descrições da doença. Além desses povos, filósofos gregos como Homero em 850 a.C e Hipócrates em 400 a.C já conheciam e descreviam as febres e esplenomegalia que acometiam indivíduos que viviam em lugares pantanosos (COX, 2010). A ideia de que as febres maláricas eram causadas por miasmas que subiam dos pântanos persistiu por cerca de 2,500 anos (COX, 2010; NÁJERA-MORRONGO, 1991).

Relatos de mortes em massa causadas por malária também foram descritas. Em Lugnano, na Itália, um cemitério infantil datado de 450 d.C foi descoberto em 1988. Os vales dos rios eram locais em que se tinham relatos de malária na Itália, pois as inundações criavam locais favoráveis para a replicação do mosquito vetor e Lugnano fica 3,5 km do rio Tibre, o que sugere que o local era altamente favorável para a doença. Devido a costumes da época e a alguns achados dos arqueólogos no local, foi apontada a hipótese de uma epidemia como causa da morte daquelas crianças. DNA do osso de uma das crianças, foi extraído para análise e fragmentos de *Plasmodium falciparum* foram achados e amplificados, indicando aos pesquisadores que muito provavelmente uma infecção massiva aconteceu para esse grande número de óbitos, pois uma infecção com baixa carga parasitária não teria sido detectada tantos anos depois. Mais recentemente, *P. falciparum* foi responsável por outra epidemia no país, levando muitas mulheres grávidas ao aborto espontâneo. Além deste relato, outras epidemias aconteceram no país ao longo do século XX (SALLARES, BOUWMAN e ANDERUNG, 2004).

Os miasmas de pântanos só foram descartados como causadores da doença com a descoberta do parasito por Charles Louis Alphonse Laveran em 1880 durante a observação do sangue de um de um paciente que sofria com febres há quase 1 mês, sendo essa a primeira observação da doença causada por *P. vivax*. Após a descoberta do parasito, foram possíveis estudos científicos mais aprofundados sobre a doença. Nessa mesma época, mais precisamente em 1897, Ronald Ross demonstrou que os mosquitos são os vetores da doença através da malária aviária, apontando mosquitos como os responsáveis pela transmissão da doença em aves. De 1898 a 1900, uma série de cientistas comprovou que os vetores da doença em humanos seriam mosquitos do gênero *Anopheles* (COX, 2010; BOUALAM et. al., 2021). Dois anos após essa descoberta, foi visto que apenas as fêmeas de *Anopheles* poderiam transmitir a doença e a descrição do estágio sanguíneo do parasito foi feita para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*

(COX, 2010). Esses achados permitiram diagnósticos e tratamentos apropriados para a doença (NÁJERA-MORRONGO, 1991).

Das viagens de Colombo até metade do século XIX, a grande maioria das mortes causadas por agentes infecciosos foram atribuídas à malária nos trópicos, com o século 19 sendo a época em que atingiu seus limites globais com mais da metade da população mundial vivendo sob o risco de contrair a doença. Entre aqueles afetados diretamente 1 em cada 10 morreriam de malária. Já no século XX, foram estimadas 6 milhões de mortes no mundo todo pela doença, em lugares onde a situação era crítica como no oeste da África, as taxas de mortalidade eram superiores a 50% (CARTER e MENDIS, 2002).

A grande maioria dos casos e mortes nessa época, aconteciam na Ásia e na África. No início do século XX uma epidemia de malária tirou a vida de dezenas de milhares de pessoas em poucos meses em uma única região na Índia, com as frequentes condições de pobreza das populações afetadas, tidas como um reforço para a suscetibilidade e efeitos tão devastadores da doença nesse local. Do início da década de 1930 até o final da década de 1940, as guerras somadas à depredação ambiental e mudanças econômicas na Ásia e na região ocidental do Pacífico, auxiliaram no aumento e dispersão da doença pela região, com altos índices de infecção e morte entre militares.

Somente no final da Segunda Guerra Mundial com a estabilização política nessas regiões e a criação de campanhas de controle da malária com suporte da recém-criada Organização Mundial da Saúde (OMS), que os índices da doença começaram a decair. Dentre as medidas adotadas para o controle da doença estavam a utilização de DDT nos domicílios e o tratamento dos infectados com cloroquina e outros antimaláricos. Essas medidas reduziram drasticamente as mortes na maioria dos países asiáticos, com destaque para Índia e Sri Lanka. Porém, os custos do programa de combate à doença aliado ao desenvolvimento de resistência dos parasitos a cloroquina e outros antimaláricos, fez com que o continente asiático enfrentasse mais uma vez números crescentes da doença no início da década de 1970 (CARTER e MENDIS, 2002).

Enquanto isso no continente africano, esforços similares aos do continente asiático para o controle da doença, não surtiram efeito devido à alta intensidade de transmissão e fatores biológicos diferentes dos parasitos dos demais continentes. O único lugar do continente em que as campanhas de controle foram capazes de praticamente erradicar a doença foi na ilha de Madagascar, que durante 20 anos, entre 1960 e 1980, teve a transmissão da doença praticamente suprimida em toda sua região. Porém em 1986 a doença foi novamente reintroduzida na ilha, nesse período as campanhas de controle já estavam enfraquecidas e a população novamente

susceptível a doença e, por consequência, uma nova epidemia se instalou na região durante 2 anos, levando a óbito a população que já havia perdido a imunidade naturalmente adquirida. Foi também na década de 1980 que os índices de mortalidade voltaram a subir no resto do continente, possivelmente por conta da resistência de *P. falciparum* à cloroquina que já chegava também no continente africano (CARTER e MENDIS, 2002).

No século XX, a malária encontrava-se em recessão em alguns lugares da Europa e América do Norte, sobretudo devido às melhorias que a humanidade alcançava na saúde e nos hábitos das populações expostas. No início do século XX, a mortalidade atribuída a malária era menor na América do Sul em relação a América Central e a região do Caribe, ocorrendo em sua maioria em áreas da região amazônica e do noroeste da costa atlântica, porém o sucesso do controle da transmissão e mortalidade da malária alcançado na Europa e na América do Norte não ocorreu na América do Sul. Dentre os fatores que contribuíram para isso destacam-se a dificuldade de acesso das áreas afetadas por estas serem remotas; a resistência a antimaláricos; e a expansão da atividade humana em áreas não habitadas na região amazônica (CARTER e MENDIS, 2002). Nas décadas finais do século XX, o controle do vetor pelo inseticida DDT auxiliou na redução do número de casos e mortes na América Central, do Sul e na região do Caribe, porém a interrupção completa da transmissão não foi atingida, ademais nessa mesma época aparecia a resistência de *P. falciparum* à cloroquina nessa região (CARTER e MENDIS, 2002; BARATA, 1995).

No Brasil, a história da malária começa a partir de sua colonização, com a indústria da borracha, construção de ferrovias e a abolição da escravidão sendo períodos marcantes para a propagação da doença em todo o território e suas tentativas de controle (GRIFFING et. al., 2015; DEANE, 1986). No início do século XX, a malária juntamente com a Ancilostomíase e a Doença de Chagas eram tidas como as causadoras do atraso econômico no Brasil e, a partir disso, várias campanhas sanitárias ao longo do século visavam extinguir a doença no país (HOCHMAN, 2010; ANDRADE, 2015). Em quase todo território brasileiro a doença de fato se extinguiu, exceto pela Amazônia, que foi responsável por quase toda a incidência no país ao longo do século XX (HOCHMAN, 2010). Na década de 60 a campanha de erradicação da doença organizada pela Organização Mundial da Saúde fez com que o número de casos no Brasil atingisse seu índice mais baixo (BARATA, 1995).

Porém no início da década de 80 o número de casos triplicou com 97,5% dos casos registrados na região amazônica. Esse aumento se deu devido a ocupação desordenada da região atrelada a instalação de garimpos, desenvolvimento agropecuário, entre outros. Fora da região amazônica os casos observados eram importados da região norte. O Índice Parasitário Anual

(IPA) é expresso pelo número de lâminas positivas por 1,000 habitantes em determinado espaço geográfico, os graus de risco configuram-se em baixo (<10,0), médio (10,0-49,9) e alto ($\geq 50,0$) (DATASUS, 2024), em 1990 todos os estados compreendidos pela Amazônia Legal apresentaram Índice Parasitário Anual acima de sete lâminas positivas a cada 1.000 habitantes, com alguns estados chegando a apresentar 3.924 lâminas positivas por 1.000 habitantes. Em todos os 79 municípios da região amazônica em que a malária estava presente, as atividades de mineração, nem sempre legais, e de expansão agrícola estavam ligadas diretamente a doença, além do mais, muitos dos indivíduos infectados circulavam por toda região amazônica e por consequência reintroduziam a doença em regiões onde esta já havia sido controlada, dificultando as ações de controle em todo território (BARATA, 1995).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Existem 5 espécies que parasitam humanos: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, com este último também infectando primatas não humanos; os primeiros casos de infecções humanas por esse parasito ocorreram a partir de 2004 na Malásia (DE ALVARENGA, et. al., 2018; SINGH e DANESHVAR, 2013). Casos de malária humana causados por *Plasmodium simium* e *Plasmodium cynomolgi*, espécies infectantes especialmente para primatas, também tem sido observado em países da Ásia e no Brasil (BRASIL. et. al., 2017b; DE ALVARENGA, et. al., 2018; TA et. al., 2014). Das espécies que infectam humanos, *Plasmodium vivax* é a mais geograficamente distribuída (BATTLE et. al., 2019). O vetor, hospedeiro intermediário do parasito e fundamental para que este possa completar seu ciclo, são mosquitos do gênero *Anopheles* (SATO, 2021).

A doença é mais comumente encontrada em áreas de população vulnerável, como por exemplo pessoas em situação de pobreza, migrantes, refugiados, entre outros, grupos normalmente afetados pela falta de políticas públicas voltadas para o sanitarismo e com pouco acesso a serviços de saúde. Mulheres grávidas se encontram em risco para do desenvolvimento de malária grave quando acometidas pela doença por *P. falciparum*, pois a infecção pode levar ao nascimento prematuro, a morte da mãe ou do feto (GREENWOOD e MUTABINGWA, 2002).

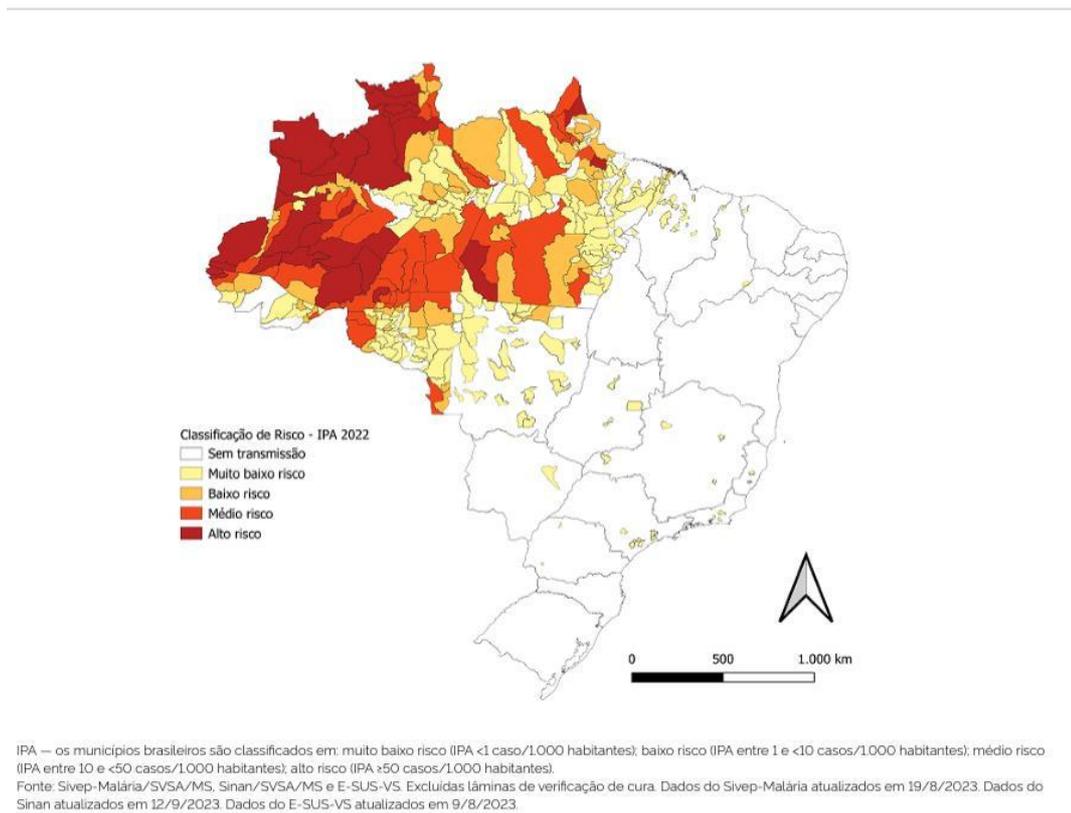
A doença causada por *P. falciparum* é a que mais gera preocupação devido às complicações causadas pelo parasito. No entanto, indivíduos infectados por *P. vivax* que não são tratados rapidamente e/ou adequadamente, também podem desenvolver complicações como

falência renal, trombocitopenia, edema pulmonar, entre outros, incluindo até mesmo dano cerebral em alguns casos (NAHA, DASARI e PRABU, 2012; KOCHAR et. al., 2005). Além das complicações apresentadas, *P. vivax* possui características biológicas distintas das demais espécies, como a rápida maturação de seus gametócitos (BOUSEMA e DRAKELEY, 2011) e, juntamente com *P. ovale*, são as únicas espécies que apresentam hipnozoítos. Essas formas de vida se encontram dormentes no fígado e podem ser espontaneamente ativadas em questão de semanas ou meses por mecanismos ainda não conhecidos (PRICE et. al., 2007), causando as chamadas recaídas tardias (BATTLE et. al., 2019; ROBINSON et. al., 2015).

Em 2022, a malária foi responsável por cerca de 249 milhões de casos clínicos registrados, um aumento de 5 milhões em relação a 2021, e cerca de 608 mil mortes no mundo todo. A doença se concentra em países tropicais e subtropicais e em 2022, 29 países concentraram 95% dos casos mundiais, com Nigéria (27%), Congo (12%), Uganda (5%) e Moçambique (4%), sendo responsáveis por quase metade dos casos no mundo todo. Além disso, Nigéria (31%), Congo (12%), Níger (6%) e Tanzânia (4%) foram responsáveis por 96% das mortes por malária no mundo todo. Quando comparamos os dados atuais de número de casos e mortes com os dados relatados de 2000 a 2022, percebemos uma queda de 64% nos casos relatados e 72,5% nas mortes. A proporção de casos por *Plasmodium vivax*, espécie mais prevalente fora do Continente Africano, também reduziu, passando de 8% em 2000 para 3% em 2022 (WHOc, 2023).

Dos 249 milhões de casos registrados no mundo todo, 6 milhões aconteceram nas Américas, uma queda de 64% em comparação com 2021. O número de mortes também apresentou uma queda de 63%, em comparação com 2020 e 2021, com 343 mortes confirmadas no continente em 2022. Venezuela, Brasil e Colômbia foram os responsáveis por 73% dos casos da doença nas Américas, com a maioria delas sendo devido a *Plasmodium vivax* (WHO, 2023c). Nesse cenário, os dados do Brasil mostram que em 2022 131.224 casos foram notificados com 13,9% dos casos autóctones notificados atribuídos a *P. falciparum*, infecções mistas foram responsáveis por cerca de 1,8% dos casos, enquanto 84,2% dos casos notificados foram atribuídos a *P. vivax* (Figura 2). 62 óbitos foram notificados em todo o país, sendo 48 na região amazônica, endêmica para a doença e 14 na região extra-amazônica (Ministério de Saúde, 2024).

Figura 2 – Estratificação dos municípios segundo a IPA – Brasil, 2022



Fonte: Ministério da Saúde, (2024).

1.3 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo de vida dos plasmódios é complexo e apresenta dois hospedeiros: um vertebrado, como hospedeiro intermediário, e um invertebrado, mosquitos do gênero *Anopheles*, como hospedeiro definitivo (Figura 3) (SICILIANO e ALANO, 2015).

No Brasil, circulam cerca de 60 espécies de *anofelinos*, entre eles *Anopheles darlingi*, considerado como o principal vetor da doença em humanos principalmente na região Amazônica (LOUNIBOS e CONN, 2000). Já na região extra-amazônica *An. aquasalis* e *An. albitarsis* são as espécies mais importantes na transmissão (BRASIL, 2019).

No hospedeiro vertebrado, o ciclo se inicia com a picada da fêmea infectada do mosquito. Nesse momento, são injetados diretamente na derme do hospedeiro os esporozoítos, juntamente com substâncias vasodilatadores e anticoagulantes (SICILIANO e ALANO, 2015; TUTEJA, 2007; KRETTLI e MILLER, 2001). A seguir, atingem os vasos sanguíneos sendo carregados até o fígado. Porém alguns desses esporozoítos acabam migrando para o sistema linfático possivelmente dentro de leucócitos onde são, em sua maioria, degradados

(SICILIANO e ALANO, 2015; PRUDÊNCIO, RODRIGUEZ e MOTA, 2006; AMINO et. al., 2006).

Os esporozoítos que conseguem chegar ao fígado, penetrarão nos hepatócitos. Para que a infecção dessas células ocorra com sucesso, o parasito precisa atravessar diferentes células e para que tenha êxito conta com o auxílio da Proteína de Passagem Celular de Oocinetos e Esporozoítos (CeLTOS) (FREVERT et. al., 2006; JIMAH et. al., 2016). Outra proteína essencial para a interação parasito-célula hospedeira é a Proteína Circumsporozoíta (CSP). Considerada como uma grande proteína de superfície dos esporozoítos de *Plasmodium*, a CSP é importante nos processos de motilidade do parasito e no reconhecimento dos hepatócitos via interação com Proteoglicanos de Sulfato de Heparano (HSPGs) presentes nos hepatócitos. Essa proteína é composta por um domínio terminal-N, uma região I, clivada durante a invasão celular, uma região central repetida, um domínio TSR α e um terminal-C âncora de membrana de glicosilfosfatidilinositol (MACMILLEN et. al., 2024; TEWARI et. al., 2002; RATHORE et.al., 2002; SINNIS et. al., 1994; COPPI et.al., 2005).

Já a internalização do parasito é mediada pela Proteína Adesiva Relacionada a Trombospondina (TRAP), localizada primeiramente nos micronemas e posteriormente translocada para a superfície celular durante a locomoção e processo de invasão (ROGERS et. al., 1992; KAPPE et. al., 1999; GANTT et. al., 2000). Seu ectodomínio possui dois padrões adesivos: um domínio A integrina-like e uma repetição trombospondina tipo I, ambos interagem com proteoglicanos presentes nos hepatócitos e estão envolvidos na invasão a célula hospedeira (PRUDÊNCIO, RODRIGUEZ e MOTA, 2006; SULTAN et. al., 1997; MÜLLER et. al., 1993; ROBSON et. al., 1995; MATUSCHEWSKI et. al., 2002; PRADEL, GARAPATY e FREVERT, 2002). Durante a invasão da célula hepática ocorre uma invaginação da membrana plasmática dessa célula, formando então um vacúolo parasitóforo onde, por meio de uma cascata de eventos, o parasito se multiplicará (MESÉN-RAMÍREZ et. al., 2019; EKSI e WILLIAMSON, 2011).

O vacúolo sustenta complexos proteicos importantes para a sobrevivência intracelular do parasito, com um poro não seletivo presente no vacúolo sendo o responsável por permitir a passagem de monossacarídeos, aminoácidos e outros nutrientes (MESÉN-RAMÍREZ et. al., 2019). A replicação desse parasito ocorrerá assexuadamente por um processo denominado esquizogonia (ou esquizogonia exoeritrocítica). Nesse caso, múltiplas rodadas de replicação de DNA acontecem seguidas de divisão nuclear sem divisão citoplasmática, no final da esquizogonia o citoplasma então se divide formando assim os esquizontes que contém centenas de merozoítos hepáticos, contendo cada um único genoma e organelas essenciais (LEETE e

RUBIN, 1996; STANWAY et. al., 2009; LINDNER, MILLER e KAPPE, 2012; BRAY e GARNHAM, 1982; SOULARD et. al., 2015; GOSWAMI et. al., 2020). Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns dos esporozoítos permanecem no fígado em estado de latência sendo denominados hipnozoítos, os quais podem dar continuidade ao ciclo após dias, meses ou anos decorridos da infecção (SICILIANO e ALANO, 2015).

Após a maturação dos esquizontes nos hepatócitos, estes liberam os merozoítos para a corrente sanguínea para então iniciarem o ciclo nos eritrócitos (SICILIANO e ALANO, 2015). Os eritrócitos dos mamíferos não possuem recursos para suportar crescimento e divisões sucessivas em seu interior, de forma a contornar essa dificuldade *Plasmodium spp.* em sua forma sanguínea é capaz de liberar uma variedade de proteínas efetoras capazes de remodelar a célula sanguínea criando um ambiente propício para seu desenvolvimento (SPILLMAN, BECK e GOLDBERG, 2015; BECK e HO, 2021). A fase eritrocítica começa com os merozoítos sendo liberados das células hepáticas e entrando na corrente sanguínea onde infectam as hemácias (MANDALA et. al., 2021). No sangue periférico, as principais populações eritrocitárias encontradas são reticulócitos e normócitos, com as diferentes espécies de *Plasmodium* mostrando determinadas preferências em relação ao tipo de eritrócito que infectam: *P. falciparum* invade eritrócitos de todas as idades, *P. vivax* invade preferencialmente reticulócitos Duffy positivos, *P. malariae* e *P. knowlesi* invadem eritrócitos maduros enquanto *P. ovale* prefere reticulócitos (IYER et. al., 2007).

Os merozoítos, na corrente sanguínea, iniciam o processo de reconhecimento e invasão dos eritrócitos com o reconhecimento inicial sendo mediado por interações de Proteínas de Superfície de Merozoíto 1-4 (MSP) com resíduos de ácido siálico presente na superfície das hemácias (TUTEJA, 2007). A seguir, ocorre a reorientação do parasito de modo que sua extremidade apical esteja de face com a membrana do eritrócito (DE NIZ et. al., 2017). Então, algumas das organelas do complexo apical, especialmente micronemas e roptrias, secretam proteínas ligantes de duas famílias específicas: Antígenos de Ligação Eritrocítica (EBA) e Proteína Semelhante a Proteína de Ligação de Reticulócitos (RBL) como, por exemplo, a RH5 que juntamente com CyRPA e RipR auxiliam na formação de uma junção com seus receptores na superfície dos eritrócitos ligando então o parasito a célula (PAUL, EGAN e DURAISINGH, 2015; KOCH e BAUM, 2016; MUNJAL, KANNAN e SINGH, 2023; HART et. al., 2023).

Após a formação de uma junção comunicante, o motor de actina-miosina é acionado (BURNS et. al., 2019) e para o sucesso da invasão, também é secretada a Proteína de Pescoço de Roptria 2 (RON-2) que se liga ao Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) presente na superfície do merozoíto (LAMARQUE et. al., 2011). AMA-1 então quando ligada a RON-2

forma um complexo proteico na junção entre o merozoíto e o eritrócito para assim dar início a invasão (COELHO et. al., 2017; DE NIZ et. al., 2017; LAMARQUE et. al., 2011). Ao final do processo de invasão o parasito encontra-se envolvido por um vacúolo parasitóforo (AIKAWA, 1977) onde se reproduzirá assexuadamente também por esquizogonia (AUNIN et. al., 2020). Dentro dos eritrócitos, o parasito se alimenta da porção globina da molécula de (CORONADO, NADOVICH e SPADAFORA, 2014). Por outro lado, a porção heme, naturalmente tóxica para o parasito, é convertido em uma forma metabolicamente cristalizada chamada hemozoína, (CORONADO, NADOVICH e SPADAFORA, 2014; GOWDA e WU, 2018).

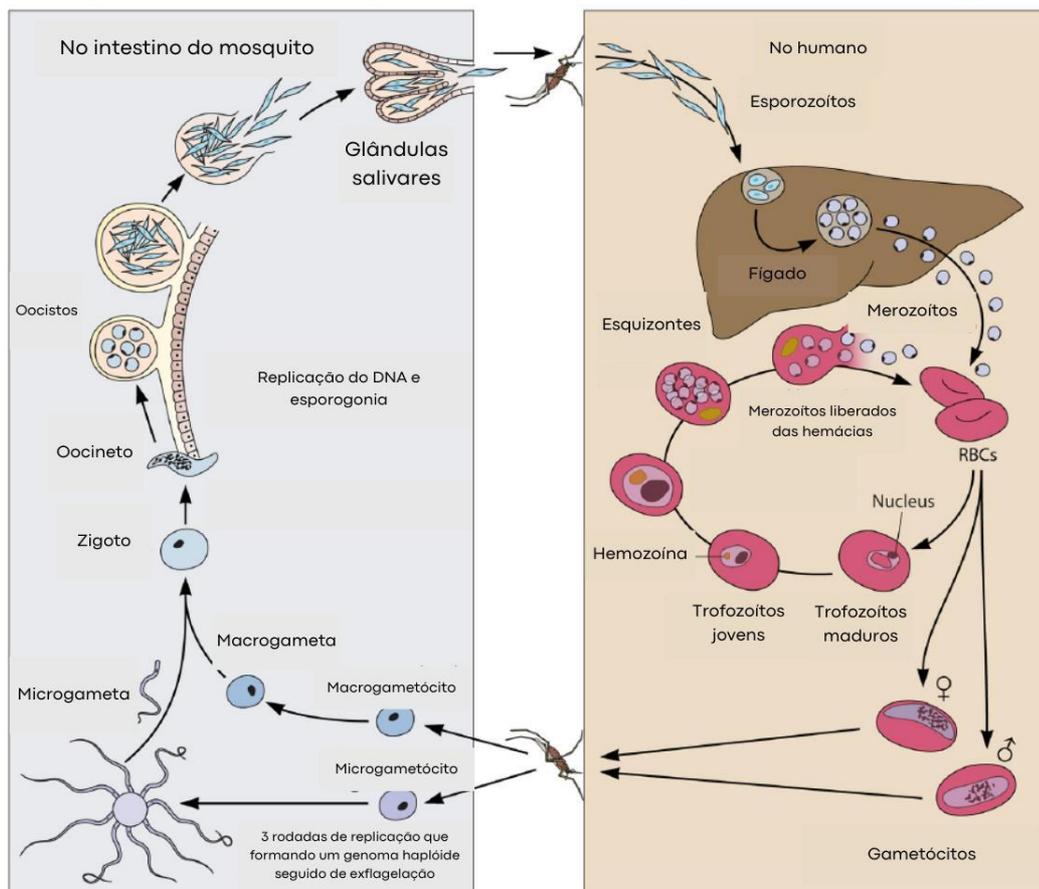
Durante o processo de esquizogonia, cada trofozoíto passa por uma fase em que sua morfologia se assemelha a um anel (trofozoítos jovens), posteriormente aumenta de tamanho e esse aumento é acompanhado de alta atividade metabólica com glicólise, ingestão citoplasma do hospedeiro rico em hemoglobina e a proteólise de hemoglobina em aminoácidos constituintes (TUTEJA, 2007; WIPASA et. al., 2002; SOJKA, JALOVECKÁ e PERNER, 2022; WUNDERLICH, ROHRBACH e DALTON, 2012). O final da fase de trofozoíto é marcada por muitas divisões nucleares resultando na formação de esquizontes com cada esquizonte liberando de 6 a 32 merozoítos, a depender da espécie (TUTEJA, 2007; WIPASA et. al., 2002). O rompimento da hemácia para liberação dos merozoítos coincide com os picos de febre que o paciente apresenta, sendo que para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* esse processo de invasão-multiplicação-liberação ocorre a cada 48 horas, enquanto para *P. malarie* ocorre a cada 72 horas.

Quando os eritrócitos são rompidos, todas as substâncias internas são liberadas o que estimula a produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF) entre outras citocinas que ocasionam a febre e demais sintomas clássicos (SICILIANO e ALANO, 2015; TUTEJA, 2007; KWIATKOWSKI et. al., 1989). Alguns desses merozoítos se diferenciam em microgametócitos (masculinos) e macrogametócitos (femininos) e para que isso aconteça, a atuação do fator de transcrição ApiAP2-G é essencial (HART et. al., 2021). Em *P. falciparum* estes demoram cerca de 10-12 dias para amadurecerem, enquanto para *P. vivax* e *P. ovale* levam 48 horas e para *P. malariae* de 5-23 dias (SICILIANO e ALANO, 2015; DE JONG et. al., 2019; TUTEJA, 2007).

A fêmea do mosquito Anopheles, quando faz seu repasto sanguíneo ingere então os gametócitos dando início a esporogonia (ZOLLNER et. al., 2006). A combinação entre a baixa temperatura do intestino médio do mosquito e do fator solúvel derivado do mesmo, o ácido xanturênico, faz com que os microgametócitos passem por três rodadas de mitose formando então oito microgametas enquanto as fêmeas formam apenas um macrogameta (TAN e BLACKMAN, 2021). Após essa transformação, os gametas femininos se fusionam com os

masculinos no intestino médio do inseto, formando então um zigoto diploide que se desenvolve em um oocineto móvel (GERALD, MAHAJAN e KUMAR, 2011; SICILIANO e ALANO, 2015; TUTEJA, 2007). Esse oocineto atravessa o epitélio do intestino médio, aqui também auxiliado pela proteína de superfície CelTOS, formando então oocisto que se aloja abaixo das células epiteliais e é circundado pela lâmina basal (SIDEN-KIAMOS, SPANOS e CURRÁ, 2020; JIMAH et. al., 2016), lá esse oocisto sofrerá sucessivas divisões mitóticas gerando milhares de esporozoítos (GUTTERY et. al., 2020) que após liberados do oocineto seguem em direção as glândulas salivares do mosquito. Essa forma se encontra nas glândulas salivares de 10-18 dias após a ingestão dos gametócitos e fazem com que a fêmea permaneça infectada por até 2 meses (SICILIANO e ALANO, 2015; TUTEJA, 2007). Assim, ao realizar um novo repasto sanguíneo, injetará os esporozoítos reiniciando o ciclo (KLUG e FRISCHKNECHT, 2017; PEREIRA-SILVA et. al., 2022).

Figura 3 – Ilustração esquemática do ciclo biológico de *Plasmodium spp.*



Fonte: Traduzido e adaptado de LEE, SYMINGTON e FIDOCK, (2014).

1.4 MALÁRIA E SEUS AGRAVOS

A doença tem caráter febril sendo acompanhada por dores de cabeça e calafrios, com os sintomas aparecendo de 10 a 15 dias após a picada (ZAWAWI et. al., 2020). Outros sintomas podem incluir náuseas, vômito, azia, tontura, dor nas articulações, dor nas costas, dor abdominal, dor na coluna, sudorese, fraqueza, perda de apetite e diarreia (WHO, 2022a; BRIA, YEH e BEDINGFIELD, 2021). A anemia, sinal mais prevalente da doença, pode ser causada por diferentes mecanismos como a destruição das hemácias infectadas e não infectadas e a diseritropoiese, que é resultado da produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF e inibidores de migração de macrófagos pelo hospedeiro (HOTEZ et. al., 2006).

A malária grave é caracterizada como a condição em que ocorre aderência de eritrócitos infectados ao endotélio vascular ocasionando sua obstrução (WHITE, 2022; CHEN, SCHLICHOTHERLE e WAHLGREN, 2000). Esse processo é ainda potencializado pela formação de rosetas (eritrócitos infectados ligando-se a eritrócitos não infectados) e de pequenos trombos (hemácias parasitadas ligando-se a plaquetas) (WASSMER e GRAU, 2017; ROWE et. al., 1995; PAIN et. al., 2001). A citoaderência, bem caracterizada sobretudo nas infecções por *P. falciparum*, ocorre de forma sistêmica através da ligação das proteínas de superfície do parasito com o endotélio microvascular de diferentes órgãos e tecidos, sendo mediada por múltiplos receptores tais como: a Molécula 1 de Adesão Intracelular (ICAM-1), CD36, Selectina-E, Molécula de Adesão Celular Neural (NCAM), CD31 (PECAM-1) e Sulfato de Condroitina A (CSA) (WASSMER et. al., 2015).

O desenvolvimento da malária grave pode desencadear uma série de complicações a depender de fatores como idade, exposição e status imune do hospedeiro (WASSMER et. al., 2015). A mortalidade associada à malária grave é geralmente superior a 5%, representando um aumento de mais de 50 vezes no risco de morte. As manifestações clínicas principais de malária grave em crianças são malária cerebral, acidose metabólica (ou síndrome do desconforto respiratório) e anemia grave. Malária cerebral e acidose também são manifestações clínicas muito presentes em adultos, porém a anemia grave é menos comum nesse grupo, além de que muitos adultos podem apresentar lesão renal aguda frequentemente acompanhada por icterícia (WHITE, 2022).

1.5 CONTROLE DA MALÁRIA

Entre as principais estratégias de prevenção e controle da doença destacam-se: o controle do vetor com mosquiteiros e uso de inseticida de ação residual; diagnóstico e tratamento rápido, além de quimioterapia preventiva baseada no uso de medicamentos combinados para populações vulneráveis (viajantes, crianças até os 5 anos e mulheres grávidas). E finalmente, a mais recente estratégia adotada pela OMS em 2021, a vacinação de crianças que se encontram em áreas de grande risco para malária causada por *P. falciparum* (WHO, 2023c).

A quimioterapia recomendada vai depender de vários fatores, incluindo a espécie. Para *P. falciparum* a quimioterapia consiste na terapia combinada a base de artemisinina, para *P. vivax* é recomendado o uso da cloroquina, e primaquina é recomendada para tratar as recaídas causadas por *P. vivax* e *P. ovale* (WHO, 2024c). A quimioterapia preventiva utiliza-se de sulfadoxinepirimetamina adicionado ou não de amodiaquina, ou da terapia combinada a base de artemisinina a depender de fatores como idade e exposição, sendo utilizada para crianças, grávidas, viajantes ou pessoas que vivem em lugares de alta transmissão (WHO, 2024a). 5 classes de inseticidas são recomendadas para o controle dos anofelinos, são essas: piretróides, carbamatos, organofosforados, organoclorados e neonicotinóides (ODERO et. al., 2023), além das recomendações básicas da OMS como, por exemplo, telas de proteção tratadas com inseticidas e pulverização residual interna (WHO, 2024a).

A resistência do parasito aos fármacos utilizados também tem causado grandes dificuldades para o tratamento da doença, refletindo diretamente no controle. Além da combinação de drogas para o tratamento da malária e a buscas direcionada a novos medicamentos (BUSHMAN et. al., 2018; BUYON, ELSWORTH e DURAISINGH, 2021; WHO, 2023), grandes esforços são direcionados ao desenvolvimento de uma vacina que seja altamente eficaz e que permita um controle mais rápido e efetivo para a doença (HILL, 2011).

1.6 IMUNIDADE NA MALÁRIA

A imunidade contra a malária é uma questão muito complexa de ser debatida. Inicialmente todos os indivíduos são susceptíveis a doença, porém em áreas consideradas como endêmicas, uma imunidade à doença se desenvolve regularmente a depender do nível de exposição (MWAISWELO et. al., 2020).

A imunidade naturalmente adquirida (INA) é fundamental na malária assumindo papel de destaque contra altas taxas de morbidade e mortalidade. Em linhas gerais a INA contra a malária é um produto cumulativo de sucessivas infecções maláricas ao longo do tempo, produzindo um diverso repertório de respostas imunes espécie-específicas (DOOLAN, DOBAÑO e BAIRD, 2009). Essa imunidade é geralmente desenvolvida em indivíduos residentes de área endêmica para malária que estão constantemente expostos a picadas infectantes ao longo de vários anos. No entanto, esta imunidade não se mantém na ausência de exposição aos parasitos (MISCHLINGER et. al., 2020). Assim, em áreas endêmicas não é incomum que crianças e adultos apresentem proteção contra os sintomas clínicos ainda que na presença de parasitos circulantes em baixas densidades (LANGHORNE et. al., 2008; DOOLAN, DOBAÑO e BAIRD, 2009).

Em áreas de alta transmissão, o controle e eliminação da doença se torna mais difícil por conta da imensa quantidade de infecções crônicas assintomáticas e da extrema variação antigênica dos parasitos, fazendo com que os indivíduos infectados se tornem ainda reservatórios da doença o que sustenta as altas taxas de transmissão. Isso acontece, pois, a imunidade clínica não consegue ser alcançada pelos cidadãos devido ao grande número de variantes antigênicas que permitem o escape do parasito em relação sistema imune (HE e PASCUAL, 2021; KOEPFLI et. al., 2013).

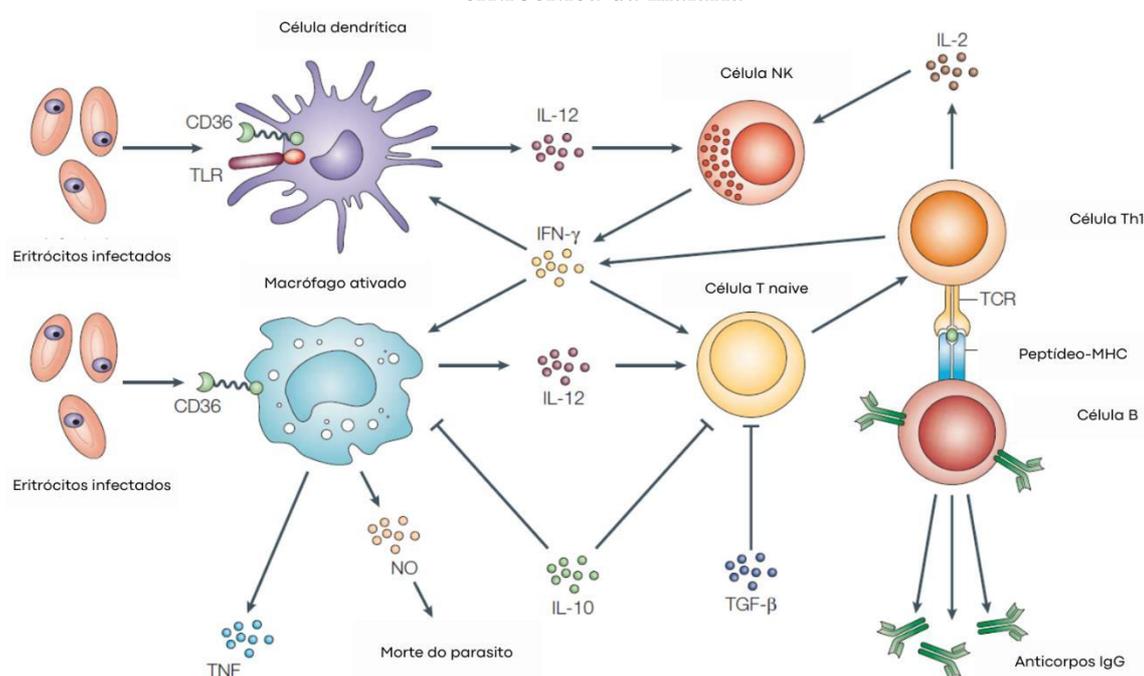
Mecanismos efetores das imunidades inata e adaptativa são capazes de limitar o pico de parasitemia do indivíduo infectado, o que previne a patologia grave da doença e reduz a carga de circulação de células infectadas, porém as imunidades não são capazes de eliminar a infecção por completo levando a uma baixa, porém persistente carga parasitária que pode não ser detectada pela microscopia, fazendo com que a doença persiste por muitos meses (STEVENSON e RILEY, 2004). Esse é um ponto importante a ser considerado já que indivíduos infectados que não manifestam sintomas podem servir como reservatórios para infecção de insetos vetores (COOK et. al., 2015).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra a malária, é uma propriedade intrínseca do hospedeiro sem a necessidade de um contato prévio com o patógeno, responsável por controlar o crescimento do parasito e regular o desenvolvimento da imunidade adaptativa (STEVENSON e RILEY, 2004; DOOLAN, DOBAÑO e BAIRD, 2009; GOWDA e WU, 2018). Esta pode ser ativada devido a produtos derivados dos parasitos como o pigmento malárico, produzido pela digestão da hemoglobina, e os antígenos do próprio parasito apresentados pelas APCs às células pertencentes a imunidade inata (PERKINS et. al., 2011). Dentre suas primeiras ações está a ativação de células dendríticas, macrófagos, células *natural killer* (NK) e células

Tyδ para o sítio de infecção, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a Interleucina 12 (IL-12), Interferon γ (IFN- γ) e TNF- α , que limitam o crescimento do parasito (STEVENSON e RILEY, 2004; DODOO et. al., 2002; ARTAVANIS-TSAKONAS e RILEY, 2002; ORISH et. al., 2021; POHL e COCKBURN, 2022), além disso a resposta pró-inflamatória também é responsável por induzir a produção de Óxido Nítrico (NO) e Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) que danificam as estruturas do parasito levando o mesmo a morte (VASQUEZ, ZUNIGA e RODRIGUEZ, 2021; ARTAVANIS-TSAKONAS e RILEY, 2002; ANDRÉS et. al., 2022).

Além das citocinas pró-inflamatórias, essas células também são as responsáveis pela secreção de citocinas imunorreguladoras como a IL-10 e o Fator de Crescimento Tumoral- β (TGF- β), responsáveis por limitar danos ao tecido causados pela resposta pró-inflamatória e ativar diferentes mecanismos efetores (STEVENSON e RILEY, 2004; DODOO et. al., 2002; ARTAVANIS-TSAKONAS e RILEY, 2002; ANGULO e FRESNO, 2002). Tanto as citocinas pró-inflamatórias quanto as imunorreguladoras são expressas por células da imunidade inata e da imunidade adaptativa (Figura 4) (STEVENSON e RILEY, 2004). Apesar da grande importância que a resposta inata tem no controle da doença, quando muito potente pode auxiliar no desenvolvimento da malária grave diretamente ou indiretamente através da amplificação dos efeitos da imunidade adaptativa (STEVENSON e RILEY, 2004).

Figura 4 – Representação esquemática do link entre a imunidade inata e adaptativa na fase eritrocítica da malária

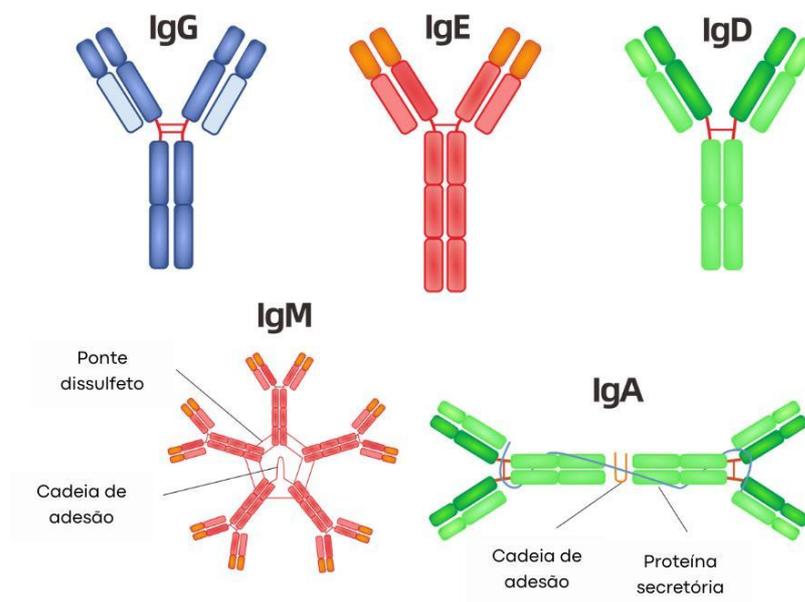


Fonte: Traduzido e adaptado de STEVENSON e RILEY, (2004).

Já a imunidade adaptativa é a responsável pela especificidade, ou seja, capacidade de distinguir diferentes substâncias, e memória, relacionada com uma resposta de maior vigor à medida que o indivíduo for reexposto ao mesmo patógeno. As células que compõem a imunidade adaptativa são os linfócitos T e B, capazes de secretar produtos específicos para o reconhecimento de diferentes antígenos (LOZANO et. al., 2021). Em relação aos linfócitos T, as TCD8⁺, auxiliadas por células TCD4⁺, são responsáveis pelo reconhecimento e morte das células hepáticas infectadas, combatendo assim o desenvolvimento do parasito no ambiente extraeritrocítico (COCKBURN et al., 2013; DE OCA et. al., 2016). Durante a fase eritrocítica, células TCD4⁺ e anticorpos são responsáveis pelo controle da infecção, com as TCD4⁺ podendo produzir anticorpos de alta afinidade (DE OCA et. al., 2016). A produção de IFN- γ por células TCD4⁺Tbet⁺, devido a resposta Th1 que a malária desencadeia em seu hospedeiro, ativa os fagócitos para que estes sejam capazes de capturar e eliminar hemácias parasitadas, além de permitir que células dendríticas e macrófagos apresentem antígenos para uma resposta ampliada das TCD4⁺ (DE OCA et. al., 2016; ZHU, YAMANE e PAUL, 2010).

Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos, moléculas essenciais na proteção contra a malária, capazes de reconhecer antígenos extracelulares podendo assim neutralizá-los e eliminá-los através de mecanismos efetores, tais como: ativação do sistema complemento, opsonização dos patógenos para fagocitose aumentada, ativação de mastócitos, etc. (SCHUR, 1988; ABBAS, 2015). Os anticorpos, secretados ou expressos na superfície dos linfócitos B, caracterizam a chamada imunidade humoral (GUTZEIT, CHEN e CERUTTI, 2018; CHAPLIN, 2010) (Figura 5). O estudo da dinâmica dos anticorpos durante e após a infecção pelo parasito é de extrema importância para mensurar a magnitude e longevidade dos mesmos, auxiliando na escolha de possíveis candidatos vacinais (TASHI et. al., 2022). Em 1961, Cohen e colaboradores demonstraram que a imunização passiva de crianças infectadas com *P. falciparum* com anticorpos IgG de adultos imunes fez com que a contagem de trofozoítos e os sintomas clínicos diminuíssem em um curto período de tempo (COHEN, MCGREGOR e CARRINGTON, 1961), desde então vários estudos têm mostrado o importante papel que os anticorpos desempenham na doença.

Figura 5 – Representação esquemática da estrutura das classes de anticorpos humanos



Fonte: Traduzido e adaptado do site:

<https://www.antibodysystem.com/archive/48.html>.

A Imunoglobulina M (IgM), única imunoglobulina expressa em todas as espécies de vertebrados, é o primeiro anticorpo a ser induzido no combate a um patógeno sendo fundamental na ativação do sistema complemento, porém sua meia vida é curta, em torno de 5 dias, fazendo com que seja substituída pela IgG em questão de poucos dias (CZAJKOWSKY et. al., 2010; BOYLE et. al., 2019; ROWE et. al., 2002; KRISHNAMURTY et. al., 2016; KEYT et. al., 2020). Nas pesquisas em malária, esse anticorpo acaba recebendo menos atenção em relação a IgG, pois pouco se sabe sobre sua dinâmica de aquisição e manutenção na doença e sobre seu possível papel na mediação de efeitos protetivos. Apesar disso, estudos recentes vêm mostrando que IgM pode estar presente tanto na patogenia da doença quanto na limitação das ações do parasito e aquisição de imunidade na malária por manter e aumentar a resposta de IgG. (CZAJKOWSKY et. al., 2010; BOYLE et. al., 2019; ROWE et. al., 2002; KRISHNAMURTY et. al., 2016).

A Imunoglobulina G (IgG) é o anticorpo mais abundante no soro humano, sendo o único a atravessar a placenta, conferindo proteção passiva ao feto. A IgG circulante possui uma meia vida que dura em torno de 21 a 28 dias (ABBAS, 2015), na malária já foi demonstrado que a

IgG é importante nos diferentes estágios da infecção pela capacidade de controlar algumas ações do parasito, como os processos de adesão e invasão (TEO et. al., 2016). As variações alélicas nas regiões constantes das cadeias pesadas de IgG, levam a mudanças nas sequências de aminoácidos das 4 subclasses existentes para este anticorpo: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (FALL et. al., 2023; VIDARSSON et. al., 2014). Em humanos, IgG1 e IgG3, ditas citofílicas, são importantes mediadores para a eliminação de patógenos (HE et. al., 2019), com ambos atuando na fixação do complemento e na fagocitose opsônica, mecanismos contribuintes na formação da imunidade protetora (OSIER et. al., 2014; JOOS et. al., 2010).

1.7 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS CONTRA A MALÁRIA

O desenvolvimento de vacinas contra a malária é tido como desafiador devido a barreiras genéticas e a complexidade que as diferentes espécies de *Plasmodium* apresentam (ARORA, ANBALAGAN e PANNU, 2021). Atualmente visa o ciclo do parasito em três pontos específicos: vacinas pré eritrocíticas, eritrocíticas e bloqueadoras de transmissão. As pré eritrocíticas tem como objetivo a proteção do indivíduo no âmbito da infecção, impedindo a chegada dos esporozoítos ao fígado; as eritrocíticas por sua vez objetivam a redução da morbidade e da mortalidade associadas à doença, visto que é nessa fase que os sintomas clínicos aparecem; enquanto as bloqueadoras de transmissão têm como objetivo bloquear o desenvolvimento do parasito no mosquito impedindo sua transmissão para o ser humano, (SKWARCZYNSKI et. al., 2020).

Em geral, as vacinas disponíveis atualmente para diversas doenças são divididas em 3 categorias: patógenos atenuados, patógenos inativados e proteínas recombinantes (HILL et. al., 2011; SKWARCZYNSKI et. al., 2020), com a grande parte dessas vacinas, incluindo as desenvolvidas para a malária, sendo de proteínas recombinantes. Essas proteínas são expressas em sistemas capazes de fazer a transcrição e tradução do DNA de forma que possa ser comercializado. O DNA recombinante é modificado para controlar o alvo promotor garantindo o sucesso na expressão da proteína alvo (LESTARI e NOVIENTRI, 2021), é um método utilizado há tempos e com o passar dos anos, vem se tornando cada vez mais eficientes de dispor de uma grande variedade de sistemas de expressão além das melhorias para a redução dos custos (SOARES e RODRIGUES, 1998; POLLET, CHEN e STRYCH, 2021). Atualmente são amplamente utilizadas na produção de vacinas em massa (SOARES e RODRIGUES, 1998), dentre as vacinas disponíveis que se utilizam desse sistema temos vacinas contra Hepatite B, HPV, Influenza, entre outros (POLLET, CHEN e STRYCH, 2021).

Na malária, as únicas vacinas recomendadas para uso em humanos são feitas a partir de proteínas recombinantes, são estas a RTS,S/AS01E e a R21/Matrix-M, ambas utilizam-se da Proteína Circumsporozoíta de *P. falciparum*, porém ambas são de baixa eficácia fazendo com que mais doses sejam necessárias para o desenvolvimento de proteção (ARORA, ANBALAGAN e PANNU, 2021; LAURENS, 2020; WHO, 2023a; ADERINTO et. al., 2024). Outras vacinas de proteínas recombinantes, expressas em diferentes sistemas, se encontram em desenvolvimento ou até na fase de estudos clínicos para diferentes espécies de *Plasmodium* (EL-MOAMLY e EL-SWEIFY, 2023; TAKASHIMA et. al., 2021; HABIBI et. al., 2022). Apesar de suas vantagens, o uso de proteínas recombinantes no desenvolvimento de vacinas também acarreta desvantagens, tais como contaminações durante expressão das proteínas, o risco do desenvolvimento de respostas autoimunes ou até mesmo uma resposta inflamatória excessiva (SKWARCZYNSKI et. al., 2020).

Desde os anos 80, época em que os primeiros esforços para o desenvolvimento de uma vacina contra malária começaram, que a corrida para o desenvolvimento de uma vacina eficaz é focada somente em *P. falciparum*, até então pensado como o parasito mais letal dentre as espécies e, com isso, o desenvolvimento de vacinas para *P. vivax* segue o que é proposto para *P. falciparum* (GALINSKI e BARNWELL, 2008; PRICE et. al., 2007; THAM, BEESON e RAYNER, 2017). Contudo, muitos desafios se estendem no desenvolvimento dessas vacinas devido às diferenças biológicas, patológicas e epidemiológicas entre as duas espécies, fazendo com que muitas das vezes não haja sucesso no uso de determinadas metodologias desenvolvidas para *P. falciparum*, em *P. vivax* (TACHIBANA et. al., 2022). Além do mais, fatores como o ciclo de vida do parasito e o entendimento incompleto acerca dos mecanismos imunológicos envolvendo a proteção acabam por dificultar o desenvolvimento de vacinas eficazes (KURTOVIC et. al., 2020; BEESON et. al., 2019).

Levando o dito acima em consideração, é mais que urgente a necessidade do desenvolvimento de uma vacina que seja eficaz contra a doença, sendo essa capaz de provocar uma resposta imune duradoura e de controlar a infecção (SUN et. al., 2003). Apesar do desenvolvimento de vacinas atualmente ser feita com base em pontos do ciclo de vida do parasito de forma individual, a vacina considerada ideal seria uma multiestágio, capaz de controlar tanto a transmissão quanto a doença estabelecida (NAHRENDORF et. al., 2015).

1.8 O USO DE PEPTÍDEOS PARA O ESTUDO DE PERFIS DE RESPOSTA IMUNE HUMORAL NA MALÁRIA

A maioria dos trabalhos disponíveis com a proposta de avaliar a imunogenicidade de diferentes proteínas dos plasmódios se utilizam de proteínas recombinantes, as quais são inquestionavelmente mais laboriosas de serem obtidas. Os peptídeos vêm tomando espaço na pesquisa científica, inclusive nas pesquisas em malária, como uma alternativa mais viável em comparação com proteínas recombinantes. Peptídeos são biomoléculas que possuem de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos através de ligações peptídicas (GUTTE, 1995), seu uso se justifica devido as suas vantagens, como a capacidade de poder construir, validar e checar *in silico* sua efetividade antes da testagem experimental, poupando ao pesquisador dinheiro e tempo (YEPES-PÉREZ et. al., 2018) e a possibilidade de uma produção em larga escala sob condições bem controladas (SOARES e RODRIGUES, 1998).

Apesar disso, poucos são os estudos que têm avaliado em campo a imunogenicidade de peptídeos sintéticos que representam distintas proteínas dos plasmódios, a grande maioria desses aborda a imunogenicidade de peptídeos de *P. falciparum* e *P. vivax* em populações naturalmente expostas (AVILA et. al., 2001; RODRIGUES-DA-SILVA et. al., 2016; MATOS et. al., 2019; BAPTISTA et. al., 2023). Destacando aqui *P. vivax*, temos trabalhos no Brasil que se referem a peptídeos de proteínas como PvAMA-1, PvCelTOS, PvMSP9, PvTRAP, entre outros, com esses se mostrando imunogênicos em populações de áreas endêmicas com frequências de respondedores superiores a 30% (SOARES et. al., 2020; RODRIGUES-DA-SILVA et. al., 2017; RODRIGUES-DA-SILVA et. al., 2016; MATOS et. al., 2019).

Vacinas baseadas em peptídeos podem possuir vantagens como a fácil produção em alta escala, possibilidade de serem armazenadas em temperatura ambiente, terem como alvo determinadas respostas imunes através da customização e o reduzido risco do desenvolvimento de doenças autoimunes e respostas alérgicas, além disso, o uso de vacinas contendo múltiplos epítomos são esperadas como sendo capazes de aumentar a resposta imune do hospedeiro e assim prevenir reinfecção (SAADI, KARKHAH e NOURI, 2017). Ensaios de imunização envolvendo peptídeos sintéticos de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* em macacos e camundongos já vem sendo performados, confirmando os peptídeos envolvidos como potenciais candidatos vacinais (HERRERA et. al., 2004; HERRERA et. al., 1994). Todavia ainda são necessários mais estudos, sendo fundamental conhecer o status imune de populações naturalmente expostas ao parasito frente aos peptídeos escolhidos, de forma a compreender quais peptídeos estão sendo reconhecidos e facilitar tanto a escolha do perfil da população alvo

quanto a interpretação dos ensaios de vacinação em comparação com a resposta naturalmente adquirida da população alvo (SKWARCZYNSKI et. al., 2020; SKWARCZYNSKI e TOTH, 2016; FERREIRA-DA-CRUZ et. al., 1995; DODOO et. al., 2011).

1.9 ANTIGENOS DE FASE EXOERITROCÍTICA PROMISSORES NA INDUÇÃO DA PROTEÇÃO CONTRA MALÁRIA VIVAX

1.9.1 Proteína de Passagem Celular de Oocinetos e Esporozoítos (CelTOS)

A Proteína de Passagem Celular de Oocinetos e Esporozoítos (CelTOS) é uma importante proteína de 25 kDa altamente conservada nas espécies de *Plasmodium* secretada nos micronemas e posteriormente translocada para a superfície do parasito a fim de mediar sua infectividade nos hepatócitos, bem como sua locomoção e passagem celular tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado (Figura 6) (PIRAHMADI et. al., 2019; KARIU et. al., 2006). Na célula do hospedeiro, se liga ao ácido fosfático formando poros no folheto interno da membrana, facilitando assim sua passagem. Quando solúvel, essa proteína se mostra como um dímero o qual os dois monômeros protegem o núcleo, que é hidrofóbico, expondo seus resíduos hidrofílicos na superfície (JIMAH et. al., 2016). Por estar presente em estágios expostos ao hospedeiro invertebrado e vertebrado, CelTOS é considerado um candidato promissor no desenvolvimento de uma vacina eficaz (ARÉVALO-PINZÓN et. al., 2020).

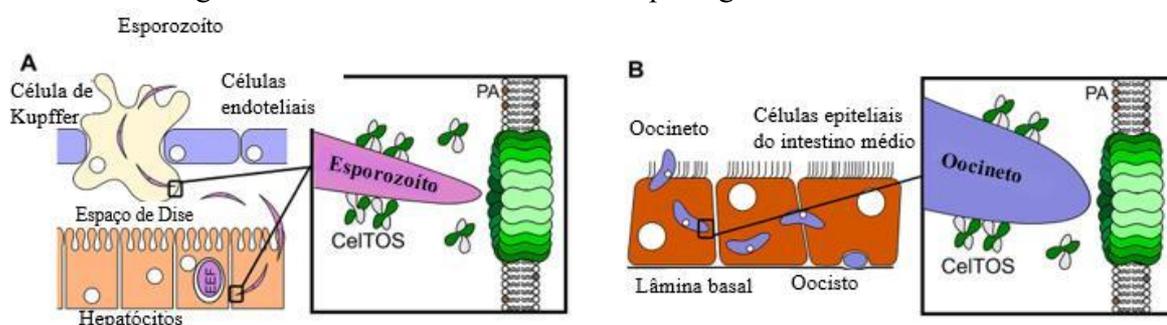
Anticorpos naturalmente adquiridos contra PvCelTOS já foram observados no Brasil e em outras partes do mundo, como por exemplo na Tailândia. No estudo que Longley e colaboradores (2016) desenvolveram na Tailândia, dois grupos de voluntários foram acompanhados por 1 ano e divididos em um grupo que teve duas ou mais infecções maláricas ao longo do ano e um grupo que não foi infectado no mesmo período. Foi visto que a positividade e magnitude de IgG contra a proteína recombinante de PvCelTOS se manteve em ambos os grupos ao longo do segmento, porém em baixa frequência (LONGLLEY et. al., 2016).

No Brasil, Rodrigues-da-Silva e colaboradores (2017) com uma coorte de indivíduos expostos da região endêmica brasileira, infectados ou não na data de coleta, também perceberam positividade e magnitude de IgG em indivíduos numa frequência baixa, porém o tempo decorrido desde o último episódio de malária variou de 0 a 480 meses nessa população, ou seja, o indivíduo que não apresentava infecção há 480 meses ainda possuía níveis de anticorpos detectáveis contra a proteína recombinante de PvCelTOS (RODRIGUES-DA-SILVA et. al., 2017). De forma a caracterizar epítomos que sejam reconhecidos por anticorpos e

assim facilitar a busca por possíveis candidatos vacinais, peptídeos são sintetizados e utilizados como ferramenta para essa função (LIMA-JUNIOR et. al., 2011). Sendo assim, Rodrigues-da-Silva e colaboradores (2017) utilizaram-se de programas de predição de epítomos para a sintetização de peptídeos contendo epítomos de células B a partir da proteína recombinante de PvCelTOS e, a partir disso, 4 epítomos foram preditos. Após a testagem de 32 peptídeos que correspondiam a sequência completa da proteína recombinante na mesma população analisada, foi visto que dois epítomos preditos apareciam inteiramente ou parcialmente nos peptídeos confirmados como naturalmente imunogênicos. Dos 32 peptídeos, 10 foram reconhecidos por anticorpos naturalmente adquiridos e 5 regiões imunogênicas foram confirmadas. Além de tudo, o peptídeo PvCelTOS^(I133-G147) apresentou a maior frequência de respondedores (92%) bem como a maior magnitude de índice de reatividade (1,71) (RODRIGUES-DA-SILVA et. al., 2017).

Em relação ao desenvolvimento de vacinas, várias pesquisas incluem PvCelTOS como candidato vacinal promissor. Alves e colaboradores em 2017, testaram PvCelTOS como alvo de 4 diferentes plataformas vacinais, todas expressando PvCelTOS como agente de preparação. Quando camundongos BALB/c inbred e CD-1 outbred foram desafiados com uma quimera de *P. berghei* que expressava a proteína recombinante de PvCelTOS, foi visto que após a primeira imunização as respostas humoral e celular foram induzidas, porém com baixos níveis de proteção em todas as plataformas vacinais. Esses baixos níveis de proteção podem provavelmente ser explicados pela baixa especificidade desses anticorpos em relação aos anti-PvCelTOS (ALVES et. al., 2017).

Figura 6 – Modelo do mecanismo de passagem celular de CelTOS



Fonte: traduzido e adaptado de JIMAH et. al. (2016). (A) Durante a fase pré-eritrocítica, os esporozoítos atravessam várias células, incluindo células de Kupffer e hepatócitos. CelTOS forma poros e rompe as membranas celulares dessas células para permitir a saída dos esporozoítos para completar a travessia. A inserção mostra que CelTOS está localizado na superfície dos esporozoítos e rompe as membranas plasmáticas ligando-se diretamente ao

ácido fosfatídico (PA) no folheto interno para criar um poro que permite a saída do esporozoíto. EEF – forma exoeritrocítica. (B) Durante a fase no mosquito, os oocinetos atravessam o epitélio do intestino médio do mosquito para alcançar a lâmina basal, onde se desenvolve em oocistos. CelTOS forma poros e rompe as membranas das células do vetor para direcionar a saída do oocineto durante a travessia através do epitélio do intestino médio do mosquito. A proteína se mostra localizada na superfície dos oocinetos, fazendo o mesmo processo de rompimento de membrana e formação de poro para a saída do oocineto.

1.9.2 Proteína Adesiva Relacionada a Trombospondina (TRAP)

A proteína adesiva relacionada a trombospondina (TRAP) é uma proteína de esporozoíto, conservada no filo *Apicomplexa*, atuando na motilidade do parasito através da ligação da cauda citoplasmática da proteína ao sistema subpelicular de actomiosina do esporozoíto (KAPPE et. al., 1999; KOSUWIN et. al., 2014) e, juntamente com a Proteína Circumsporozoíta, é necessária na invasão tanto das glândulas salivares do inseto vetor quanto nos hepatócitos do hospedeiro definitivo (Figura 7) (MÜLLER et. al., 1993; SINNIS e SIM, 1997).

Possuindo 90kDa, esta proteína pertence à família TRAP/MIC2 e se caracteriza por conter um peptídeo terminal-N hidrofóbico (domínio I), uma ligação de magnésio em uma porção semelhante a integrina contendo sítios de adesão dependentes de íon (MIDAS) (domínio A), uma repetição de trombospondina tipo I que junto do domínio II formam a região de ectodomínio da proteína (domínio III), uma região rica em asparaginina e prolina ácida (domínio IV), um domínio transmembrana hidrofóbico (domínio V) e uma cauda citoplasmática (domínio VI) (KOSUWIN et. al., 2014; TEMPLETON e KASLOW, 1997; SPRINGER, 2006). A região MIDAS é de fundamental importância no reconhecimento da TRAP com o ligante de superfície da célula, sendo que essa interação resulta na formação da fita- β que promove uma força de tensão alongando e alinhando a proteína; juntamente com esse fenômeno a região central da proteína também se alonga e o aparato actina-miosina presente na cauda de TRAP exerce uma força de tração. Toda essa movimentação juntamente com outras características presentes no reconhecimento e adesão a célula, fazem com que o parasito adentre a célula hospedeira (NAZERI et. al., 2015; SPRINGER, 2006).

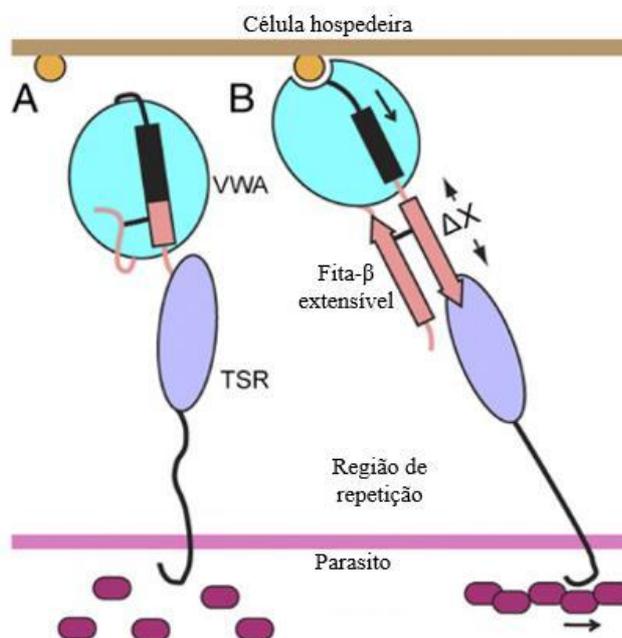
PvTRAP é uma proteína bastante estudada e assim como PvCelTOS já foram observados relatos de anticorpos adquiridos naturalmente no Brasil e em outros países. No estudo conduzido por Nazeri e colaboradores (2017), indivíduos infectados com *P. vivax* foram

recrutados das áreas endêmicas do Irã, Afeganistão e Paquistão contra uma proteína recombinante de PvTRAP e foi visto uma frequência de respondedores que ultrapassou 35% em todos os três locais (NAZERI et. al., 2017). Em 2019, Matos e colaboradores confirmaram PvTRAP como imunogênica na área endêmica brasileira, numa coorte de 299 indivíduos infectados ou não e com diferentes graus de exposição e imunidade, foi visto contra a proteína recombinante de PvTRAP uma frequência de respondedores de 49% juntamente com índices de reatividade que variavam de 1.01 a 4.29. Os relatos desses indivíduos sobre o último episódio de malária que tiveram variaram de 0 a 240 meses (MATOS et. al., 2019).

Assim como feito para PvCelTOS, epítomos de célula B também foram preditos para PvTRAP. No estudo de Matos e colaboradores (2019), a proteína recombinante de PvTRAP foi predita in silico identificando 4 epítomos de células B lineares. Estes foram testados em sua população, porém a testagem dos 4 peptídeos que correspondiam aos epítomos apresentou uma baixa frequência de respondedores. O peptídeo PvTRAP^(P344-G374) recebeu destaque entre os peptídeos testados por apresentar a maior frequência de respondedores (32%) entre eles (MATOS et. al., 2019)

PvTRAP também vem se mostrando como importante candidata vacinal por ser efetiva em induzir resposta mediada por células T em macacos e humanos (REYES-SANDOVAL et. al., 2008; WEBSTER et. al., 2005). BAUZA et. al. em 2014, vacinaram camundongos BALB/c, C57BL/6 e CD1 outbred infectados com *P. berghei* transgênico expressando PvTRAP, com dois vetores recombinantes diferentes que expressavam PvTRAP: ChAd63-PvTRAP seguido por MVA-PvTRAP, resultando em uma proteção mediada por células TCD8⁺ e por anticorpos. Os camundongos CD1 mostraram os maiores títulos de anticorpos entre as cepas. Já na resposta celular os camundongos C57BL/6 mostraram maiores frequências de células TCD8⁺. Ambos os vetores se mostraram bons candidatos vacinais de fase pré-eritrocítica para futuras aplicações clínicas (BAUZA et. al., 2014).

Figura 7 – Modelo do mecanismo de ativação da TRAP



(Fonte: Traduzido e adaptado de SONG et. al. (2012). (A) Na ausência de um ligante e da força de tração, ocorre a formação de uma orientação flexível entre os domínios VWA (Fator A de Willebrand - Domínio II) e TSR (Repetição de trombospondina). (B) Quando um ligante imobilizado se liga à TRAP através do MIDAS (Sítio de adesão dependente de íons - Domínio II), uma força de tração é exercida pelo aparato de actino-miosina. A proteína será então alongada e endireitada ao longo do vetor de força. A força de alongamento está na ativação do domínio VWA e da formação da fita β extensível.)

1.10 ANTÍGENOS DE FASE ERITROCÍTICA PROMISSORES NA INDUÇÃO DA PROTEÇÃO CONTRA MALÁRIA VIVAX

1.10.1 Antígeno Protetor Rico em Cisteína (CyRPA)

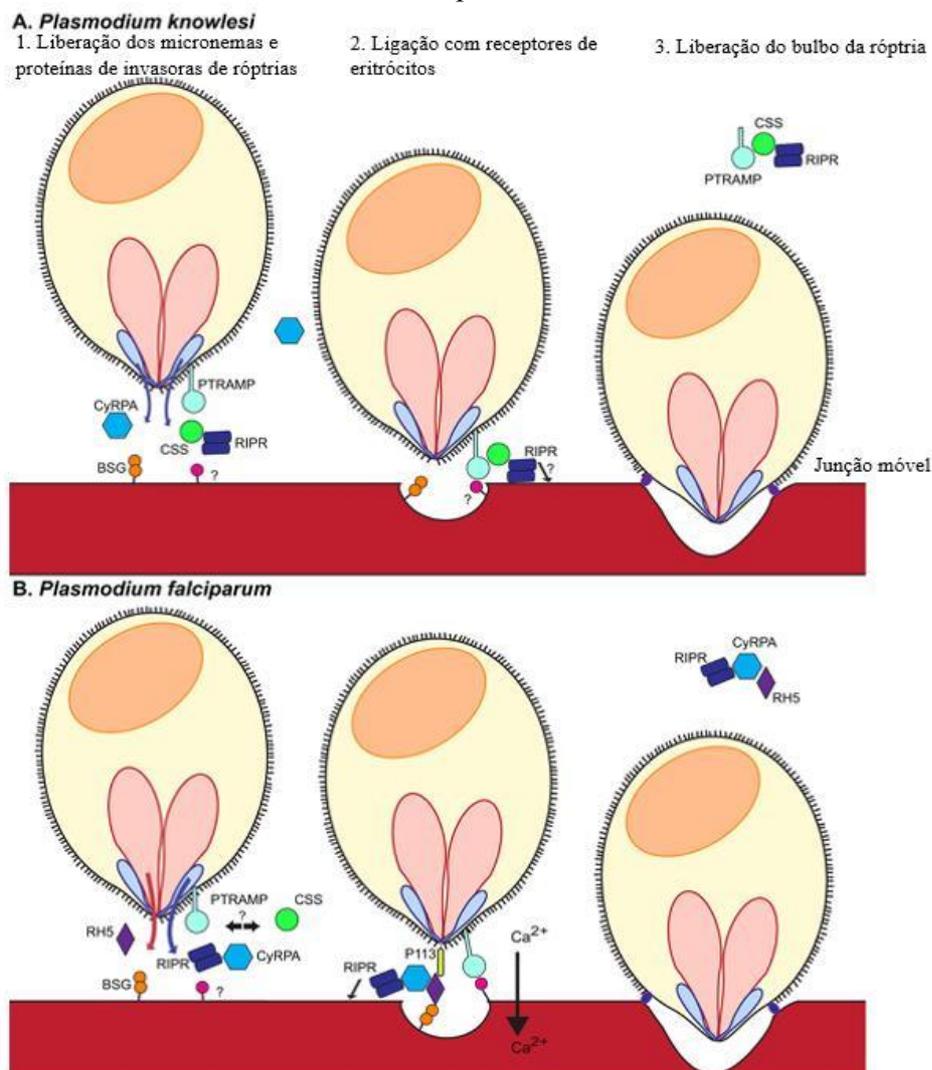
O Antígeno Protetor Rico em Cisteína (CyRPA) é uma proteína descrita recentemente sendo até o momento mais estudada em *P. falciparum* do que em outras espécies (GONZÁLEZ-CERÓN et. al., 2020). CyRPA possui 42,8kDa, 362 resíduos e se encontra presente nos micronemas dos merozoítos, auxiliando na invasão dos eritrócitos através da formação de um complexo multiproteico essencial entre o merozoíto e o eritrócito (FAVUZZA et.al., 2017). Esse complexo multiproteico é composto, além de CyRPA, pela Proteína Homóloga 5 de Ligação de

Reticulócitos (RH5) e a Proteína de Interação com RH5 (Ripr), essas proteínas se colocalizam na junção entre merozoíto e eritrócito durante a invasão ativando a liberação de Ca^{2+} através da interação do RH5 com a Basigina Receptora de Eritrócitos (BSG) na superfície, além disso também estabelece a junção comunicante, formando em seguida o vacúolo parasitóforo e por consequência a invasão ao eritrócito (Figura 8) (KNUEPFER et. al., 2019; REDDY et. al., 2015; VOLZ et. al., 2016).

Ortólogos de PfCyRPA são encontrados apenas em *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. cynomolgi* e *P. reichenowi*, compartilhando 42% de homologia com essas espécies (FAVUZZA et. al., 2017). Contudo, em relação a RH5, nenhum ortólogo foi identificado em outras espécies de Plasmodium fora das espécies concentradas no subgênero *Laverania*, já ortólogos de Ripr são encontrados na maioria das espécies de Plasmodium (KNUEPFER et. al., 2019).

Por ser uma proteína descoberta recentemente, os estudos sobre CyRPA ainda são escassos e com isso a descrição completa de suas funções ainda não foi inteiramente elucidada. Na literatura podemos observar estudos que mostram, por exemplo, a capacidade de anticorpos monoclonais contra CyRPA de inibirem a invasão de merozoítos de *P. falciparum* *in vitro* e *in vivo* utilizando-se do modelo de camundongo NOD-scidIL2R γ^{null} enxertado com hemácias humanas (DREYER et. al., 2012; TAMBORRINI et. al., 2020). França e colaboradores (2017) realizaram um estudo onde, por um período de 16 meses, crianças infectadas por *P. vivax* da Papua-Nova Guiné foram acompanhadas a fim de investigar a relação entre o risco prospectivo de malária e níveis de IgG totais contra 38 antígenos de *P. vivax*. Foi visto que níveis baixos de anticorpos direcionados a PvCyRPA são capazes de reduzir em 50% as infecções sintomáticas (FRANÇA et. al., 2017).

Figura 8 – Esquema representando a invasão do merozoíto na hemácia e o papel do complexo multiproteico



Fonte: Traduzido e adaptado de KNUEPFER et. al. (2019). (A) Invasão da hemácia por *P. knowlesi* ou (B) por *P. falciparum*. *P. knowlesi* não possui uma molécula semelhante a RH5, resultando na secreção de RlPR (Proteína de interação com o RH5) complexado com PkPTRAMP (PTRAMP de *P. knowlesi*) e PkCSS (Pequena proteína secretada rica em cisteína). O papel preciso deste complexo no processo de invasão é atualmente desconhecido, mas especula-se que PkPTRAMP como uma proteína transmembrana exibe PkRlPR e PkCSS na superfície do merozoíto após a liberação do micronema e reconhece um receptor no eritrócito humano. A BSG (Basigina Receptora de Eritrócitos) não é utilizada como receptor de eritrócitos humanos por *P. knowlesi*. Em total contraste, RH5 de *P. falciparum* e as proteínas micronemais PfRlPR e PfCyRPA (Antígeno protetor rico em cisteína de *P. falciparum*) formam um complexo trimérico após o pescoço da rópria e a secreção

do micronema. Este complexo localiza-se na superfície do merozoíto, através de uma interação entre o terminal N de RH5 e a proteína P113 ancorada em GPI, e conecta o parasita via BSG ao eritrócito hospedeiro. Especula-se que esta interação entre RH5 e BSG resulte no bulbo de roptria.

2 JUSTIFICATIVA

Plasmodium vivax configura-se como o parasito de maior dispersão no mundo. No Brasil, é a espécie de maior prevalência principalmente na região Amazônica, área endêmica para a doença. Infecções por *P. vivax* são então preeminentes no país impactando negativamente o desenvolvimento socioeconômico devido a sua elevada morbidade (WHO 2023c; BRASIL et. al., 2017a; PRICE et. al., 2007). Aliado a esse fato, torna-se cada vez mais preocupante a observação de óbitos, bem como a ocorrência de casos de resistência dessa espécie aos antimaláricos tradicionais, e do vetor aos inseticidas usuais tanto no mundo quanto na área endêmica brasileira (SILVA et. al., 2018; MARQUES et. al., 2014; DE SANTANA FILHO et. al., 2007), para mais, atualmente sabe-se que a doença causada por *P. vivax* pode se desenvolver em formas mais graves (PRICE et. al., 2007).

Todos esses fatores suportam os apelos da comunidade científica e da sociedade para o desenvolvimento de uma vacina antimalárica efetiva contra essa espécie. As únicas duas vacinas contra malária aprovadas e recomendadas pela OMS, são para *P. falciparum*, espécie de segunda maior prevalência no mundo exceto pelo continente africano, que além das duas vacinas já disponíveis, lidera as pesquisas para novos candidatos vacinais.

Devido aos muitos problemas enfrentados na construção de vacinas que têm como base proteínas recombinantes, os peptídeos surgem no cenário da pesquisa como moléculas promissoras para compor uma vacina antimalárica devido, sobretudo, sua facilidade de produção e imunogenicidade, porém a escassez de estudos focados no conhecimento da resposta de indivíduos naturalmente expostos a peptídeos acaba por atrasar o desenvolvimento de vacinas que levam peptídeos como base. Levando em consideração o dito acima, esse estudo avaliará a cinética de respostas de anticorpos antígeno-específicos em pacientes residentes de área endêmica no Brasil e, portanto, expostos a doença, durante a infecção malárica causada por *P. vivax* em sua fase aguda e convalescente.

3 OBJETIVO GERAL

Determinar a cinética da resposta de anticorpos IgG total, suas subclasses e IgM contra peptídeos que representam proteínas de fase eritrocítica e exoeritrocítica de *Plasmodium vivax* durante a fase aguda e convalescença (30 e 180 dias pós infecção) de pacientes provenientes da região endêmica brasileira.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar se os peptídeos selecionados são reconhecidos no soro de indivíduos vivendo em área endêmica de malária no Brasil, determinando a frequência e a intensidade de resposta;
- Determinar a longevidade/perfil de soroconversão dos anticorpos ao longo dos seguimentos 0 e 30; 0 e 180; e 0, 30 e 180;
- Avaliar se fatores como níveis de parasitos circulante, tempo de exposição em área endêmica e número de episódios pregressos da doença modulam a frequência de respondedores e intensidade de resposta para os antígenos.

4 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dynamics of IgM and IgG antibody response profile against linear B-cell epitopes from exoerythrocytic (CelTOS and TRAP) and erythrocytic (CyRPA) phases of *Plasmodium vivax*: a follow-up study

Cinthia Magalhães Rodolphi¹; Isabela Ferreira Soares²; Ada da Silva Matos²; Rodrigo Nunes Rodrigues-da-Silva³; Marcelo Urbano Ferreira⁴; Kézia Katiani Gorza Scopel^{1*}; Josué da Costa Lima-Junior^{2*}

¹ Research Centre of Parasitology. Department of Parasitology, Microbiology and Immunology and Post-Graduation Program in Biological Science, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil.

² Laboratory of Immunoparasitology. Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

³ Laboratory of Hantaviruses and Rickettsioses, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴ Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

* Correspondence: keziagscopel@gmail.com (Kézia K. G. Scopel); josue@ioc.fiocruz.br (Josué da Costa Lima-Junior)

Abstract: Malaria is a serious health problem worldwide affecting mainly children and socially vulnerable people. The biological particularities of *P. vivax*, such as the ability to generate liver dormant forms and rapid emergence and maturation of gametocytes in circulation, and the emergence of drug resistance have contributed to a difficult control of disease. In this context, the development of an effective vaccine has been considered a fundamental tool for the efficient control and/or elimination of vivax malaria. Although recombinant proteins have been the main strategy used in designing vaccine prototypes, synthetic immunogenic peptides appeared as a viable alternative for this purpose. Considering, therefore, that in the Brazilian endemic population, little is known about the profile of the humoral immune response directed to synthetic peptides that represent different *P. vivax* proteins, the present work aims to map the epitope-specific antibodies to synthetic peptides representing linear portions of the *P. vivax* CelTOS, TRAP, and CyRPA proteins in individuals in the acute phase (D0) and convalescence (D30 and D180 after infection) of vivax malaria. The results obtained showed that studied subjects responds to all proteins following at least six months of infection. For IgM, few individuals (3-21%) were positive during the acute phase of the disease, the highest frequencies were observed for IgG (28-57%). Regarding subclasses, IgG2 and IgG3 stood out as the most prevalent for all peptides. During the follow up, stability of IgG was observed for all peptides. No positive correlations was observed among IgM and IgG antibodies and factors of exposition. We conclude that for all the peptides, the immunodominant epitopes are recognized in the exposed population, with similar frequency and magnitude. However, if the antibodies detected in this study are potentially protectors this need to be investigated.

Keywords: malaria, immune response, PvCelTOS, PvTRAP, PvCyRPA

1. Introduction

Considered a serious global public health problem, malaria, a disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, was responsible in 2022 for about 249 million cases, and around 608 thousand deaths [1]. Plasmodia are protozoa belonging to the phylum Apicomplexa, with two of the species being the main ones existing in Brazil, *P. falciparum* and *P. vivax* [2].

From plasmodia species that infect humans, *P. vivax* is the most geographically distributed [3]. At least in part, the ability of this parasite to develop a dormant life stage in the liver of its host, called hypnozoite, causing late relapses [4-5], as well as the early circulation of its sexual stage, gametocytes have contributed to its maintenance in endemic areas of the globe [6]. Together with huge spatial distribution, the constant resistance of this parasite to antimalarials, the resistance of the vector to insecticides, and the lack of an effective vaccine are the main reasons for the search for new strategies against vivax malaria [7,8]. The RTS,S/AS01E vaccine, under the commercial name Mosquirix™, was the first human vaccine against malaria to undergo a high level of regulation [9], besides this, in 2023 the R21/Matrix-M vaccine also became recommended by the WHO, but both are aimed at children living in areas of high and moderate transmission [1] and are only partially effective against *P. falciparum* [1,10,11]. Therefore, numerous efforts are still necessary until an effective vaccine may be accessible for all plasmodia species [12].

Among all *P. vivax* proteins, the Ookinete and Sporozoite Cell Passage Protein (CelTOS), the Thrombospondin-Related Adhesive Protein (TRAP), and the Cysteine-Rich Protective Antigen (CyRPA) have been widely studied, and recently, considered as promising for vaccine development [13-15]. CelTOS is a highly conserved protein in *Plasmodium* species that is secreted in micronemes and subsequently translocated to the surface of the parasite to mediate its infectivity in hepatocytes, as well as its locomotion and cell passage in both vertebrate and invertebrate hosts [16,17]. TRAP is also a highly conserved sporozoite protein, acting on parasite motility [18,19] and, together with Circumsporozoite Protein (CS), is fundamental for the invasion of both the salivary glands of the insect vector and hepatocytes of the vertebrate host [20,21]. CyRPA is found in the micronemes of merozoites, helping invade erythrocytes through the formation of a multiprotein complex between the merozoite and the erythrocyte [22]. To date, studies show that these proteins, present in fundamental stages of the parasite's life cycle, are immunogenic and that antigen-specific antibodies correlate with natural immunity in exposed populations [23,24].

The majority of the available studies that investigate the antibody response against antimalarial antigens in exposed populations use recombinant proteins [25-28]. However, despite advances in the synthesis of recombinant proteins, its use still has many problems, such as risks of contamination during production and the possibility of developing autoimmune responses [12, 29]. On the other hand, peptides have become increasingly common in scientific research due to advantages such as the ability to construct, validate, and check their effectiveness in silico before experimental testing, avoiding spending money and time [30]. However, few studies have evaluated the immunogenicity and antibody response of

synthetic peptides that represent different plasmodium proteins in populations naturally exposed to malaria, especially after an episode of disease [12]. Therefore, in this study, we map the antibody response, during acute and convalescent phases of vivax malaria, against linear peptides representing PvCelTOS, PvTRAP, and PvCyRPA proteins in exposed subjects living in low transmission regions of Brazil.

2. Materials and Methods

2.1 Study area and participants

The complete description of the study area and patient's profile can be found in detail in Soares and colleagues (2019) (Table A1) [31]. Briefly, the selected study area belongs to the Brazilian endemic area and comprises the cities of Nova California (RO), Acrelândia, and Plácido de Castro (AC). Venous blood was collected from 56 patients presenting symptoms of malaria. The infection was initially detected by thick blood smear and, next the infective parasite species was, confirmed by PCR. After 30 (n=46) and 180 (n=24) days post-infection (convalescence phase), a new blood collection was performed. All patients signed the consent form, and completed a questionnaire reporting their previous number of malaria infections and exposure time in the endemic area, also all patients were properly treated by the guidelines of the Brazilian Ministry of Health. In addition to the infected individuals, blood was collected from 28 individuals, named Cohabitants (CH- residents of the study area who were not infected and had not had malaria infections for at least 1 year). 20 individuals who were not residents of an endemic area and who had never visited one were also named as Non-Exposed Controls (NEC), were also recruited for the study to be used in the calculation of the cut-off value. The plasma, obtained from venous blood, was stored at -20 C until the use.

2.2 Synthetic antigens

To determine the levels of antibodies specific to PvCelTOS, PvTRAP and PvCyRPA, the peptides PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374) and PvCyRPA^(T289-G307), respectively, were chosen based on previous studies [23,24], who identified and validated different epitopes as naturally immunogenic in populations exposed to infection in the Brazilian Amazon.

2.3 ELISA

The concentration of IgG antibodies and their subclasses and IgM was measured using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) technique, according to the protocol standardized previously [23]. Briefly, MaxiSorp 96-well plates were sensitized with 20µg/mL of each antigen for IgG total and 5µg/mL for the IgG subclasses and IgM and then incubated overnight in a humidified oven at 37°C. Next, the plates were washed 3x with 1X Phosphate Buffered Saline (PBS) and then blocked with 200µL of 4% Bovine Serum Albumin (BSA) for 1h30min at 37°C in a humid oven. Then the 4% BSA was discarded, and the samples diluted 1:100 in 2% BSA were added to the plates, which was incubated again for 2 hours at 37°C in a humid oven. Next, the plates were washed 3 times with PBS-Tween 0,05%. After monoclonal antibodies diluted in 2% BSA were added to the plate (IgG 1:1000, IgG1 1:4000, IgG2 1:2000, IgG3 1:4000, IgG4 1:4000, IgM 1:1000) were incubated for 1 hour at 37°C in a humid oven. Finally, the

plates were washed 3 times with 0,05% PBS-Tween and 1 time with PBS 1X. IgG total was revealed with o-phenylenediamine dihydrochloride (o-phenylenediamine dihydrochloride – OPD) while subclasses and IgM were revealed with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (tetramethylbenzidine – TMB). All reactions were stopped with H₂SO₄ and absorbance was determined in the ELISA reader (Bio-Tek, Winooski, VT) at 490nm. The cut-off value was determined from the average of the negative controls (subjects living in the non-endemic area) plus 3 times the standard deviation. The Reactivity Index (RI) was obtained by dividing the absorbance value by cut-off, individuals with IR ≥1 are considered to have detecting antibodies while individuals with IR <1 are considered negative.

2.4 Statistical analyzes

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 9.5.1 program for Windows. Differences in antibody frequencies between groups were tested first by the Chi-Square test followed by Fischer's post-test. The magnitude of the Reactivity Indexes was measured using the Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney post-test. The follow-up analyses were measured by the Friedman test, followed by the Wilcoxon test. Correlations were tested using Spearman's test for parametric data and Pearson's test for non-parametric data. P values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Patterns of IgM and IgG antibody response

Naturally acquired antibodies during malaria infection are considered fundamental in controlling the clinical evolution of the disease [32,33]. Thus, the first parameters evaluated in this study were the frequencies of responders and IgM and IgG antibody reactivity profiles against peptides representing the exoerythrocytic (TRAP^(P344-G374) and CelTOS^(I133-G147)), and erythrocytic stage proteins (CyRPA^(T289-G307)) of *P. vivax*. Interestingly, the frequencies of IgM and IgG positive responses for all peptides, independently of the cycle phase, were similar among infected individuals (acute phase) and CH ($p > 0,05$). However, a higher frequency of positive responses was observed for proteins from the exoerythrocytic stage, especially for IgG when compared to IgM ($p < 0.05$).

Regarding RI, the higher range were observed to IgG. Specifically, to this immunoglobulin was observed a range from 1.0 to 3.3 for PvTRAP^(P344-G374); 1.0 to 2.4 for PvCelTOS^(I133-G147); and 1.0 to 1.7 for PvCyRPA^(T289-G307) for the individuals in the acute phase of the infection and for subjects only exposed to the infection (CH) (Figure 1A, 1B and 1C).

During the convalescence phase of the disease (30 and 180 dpi), once again a similar profile in the frequency of positive responses was observed for IgM and IgG in all peptides (Figure 2A, 2B and 2C); IgG being the most common immunoglobulin in the serum of the individuals studied specially for exoerythrocytic proteins. Interestingly, for PvCyRPA^(T289-G307) 36% of subjects presented IgM at 30dpi versus 21% observed during acute phase of infection (Fig 2C and 1A). Regarding RI profile, the levels IgG ranged from 1.0 to 6.2 for PvTRAP^(P344-G374), 1.0 to 2.6 for PvCelTOS^(I133-G147), and 1.0 to 1.8 for PvCyRPA^(T289-G307) (Figure 2A, 2B and 2C).

In this study we also investigated the impact of primary infection on the frequency and magnitude of IgM response for all peptides. Interestingly, the frequency of positive responders and RI were similar

between individuals suffering first or multiples malaria episode (Figure A2).

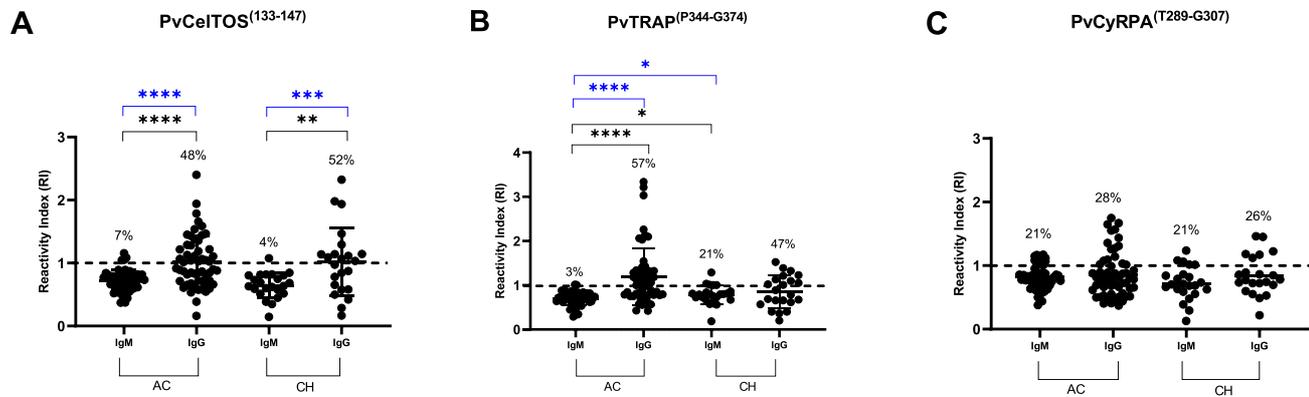


Figure 1. Profile of the antibody response (frequency of responder and Reactivity Index) against PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374), and PvCyRPA^(T289-G307) in the acute phase of *P. vivax* infection and in CH individuals. The dashed line represents the cut-off that separates responders from non-responders. The horizontal line in the scatter plots represents the median RI value. Each sample was tested in duplicate by ELISA. Statistical significance of the frequency of responders at different points for each antigen was assessed using the Chi-square test with Fischer's post-test for multiple comparisons. Statistical significance of the RI observed at different points for each antigen was assessed using the Kruskal Wallis test with Mann-Whitney post-test for multiple comparisons ($p < 0.05$). The bars represent statistical differences between the groups, the black ones indicate the differences in the observed RI and the blue ones refer to the frequency of positive responders CH (cohabitants). Ac: IgG and IgM: $n = 56$, CH: IgG and IgM $n = 23$.

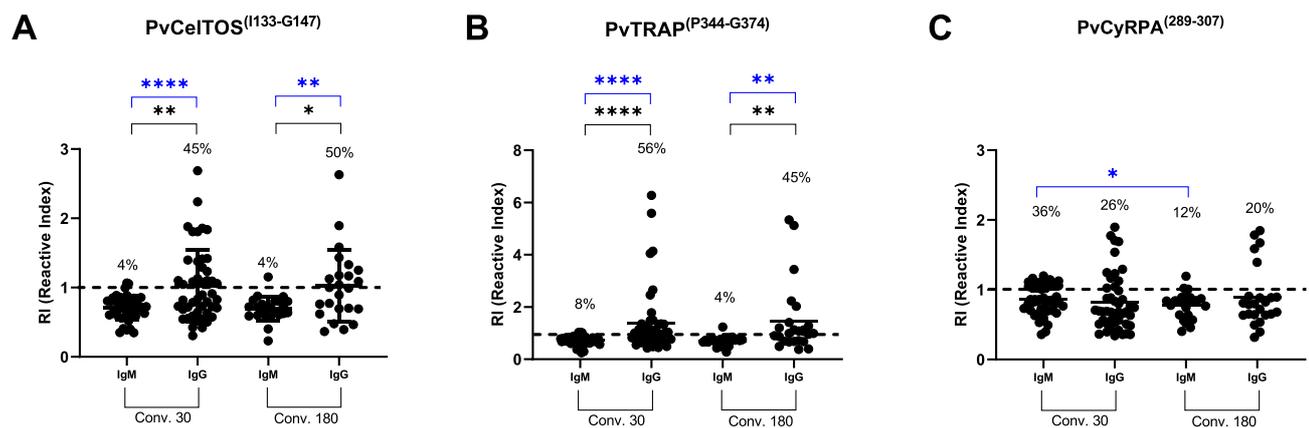


Figure 2. Profile of the antibody response against PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374) and PvCyRPA^(T289-G307) during the convalescent phase (30 and 180 days post-infection) of *P. vivax* infection. The dashed line represents the cut-off that separates responders from non-responders. The horizontal line in the scatter plots represents the median IR value. Each sample was tested in duplicate by ELISA. Statistical significance of the frequency of responders at different points for each antigen was assessed using the Chi-square test with Fischer's post-test for multiple comparisons. Statistical significance of the RI observed at different points for each antigen was assessed using the Kruskal Wallis test with Mann-Whitney post-test

for multiple comparisons ($P < 0.05$). Conv. 30 (Convalescent 30 days), Conv. 180 (Convalescent 180 days). n Conv. 30 = 46, n Conv. 180 = 24.

3.2. Pattern of antigen-specific IgG1, IgG2, and IgG3 antibody response

Next, individuals with IgG antibodies were selected and the frequency of responders and RI for IgG1, IgG2, and IgG3 were also determined at all follow-up points. For PvCelTOS^(I133-G147), the highest frequency of responders was observed for IgG2, especially at 180 days of follow-up (22, 28, and 50% of responders in the acute, 30, and 180 groups, respectively). For cytophilic subclasses, IgG1 tended to an increase in the frequencies of responders over time (11, 9, and 25% for acute, 30, and 180 groups, respectively). By the other hand, the frequencies of subjects IgG3 positive reduced over time (22, 14, and 0% of responders at the acute, 30, and 180 groups, respectively). Interestingly, the frequencies observed in the CH group were similar to those observed in individuals from the 180 group. Regarding RIs, these ranged from 1.0 to 2.8 (Figure 3A).

For PvTRAP^(P344-G374), the frequencies of positive responders and RI for all IgG subclasses were similar during follow-up ($p > 0.05$). Once again, individuals exposed to the disease, but free from infection, also presented cytophilic (IgG1 and IgG3) and non-cytophilic (IgG2) antibodies, as seen in the infected group; curiously the highest frequency observed for IgG3 was from the CH for PvTRAP^(P344-G374) with 72% of responders. The IRs ranged from 1.0 to 1.8 (Figure 3B).

Finally, for PvCyRPA^(T289-G307), the highest frequencies of IgG subclasses were observed on day 30 post-infection. In this point of follow-up, the most prevalent subclass was IgG2 (42%), followed by IgG1 (33%) and IgG3 (8%). Interestingly, six months after infection 20% of subjects still had detectable IgG2 antibodies. Regarding RI, the variation seen was from 1.0 to 2.0, a magnitude similar to those observed for the exoerythrocytic peptides (Figure 3C).

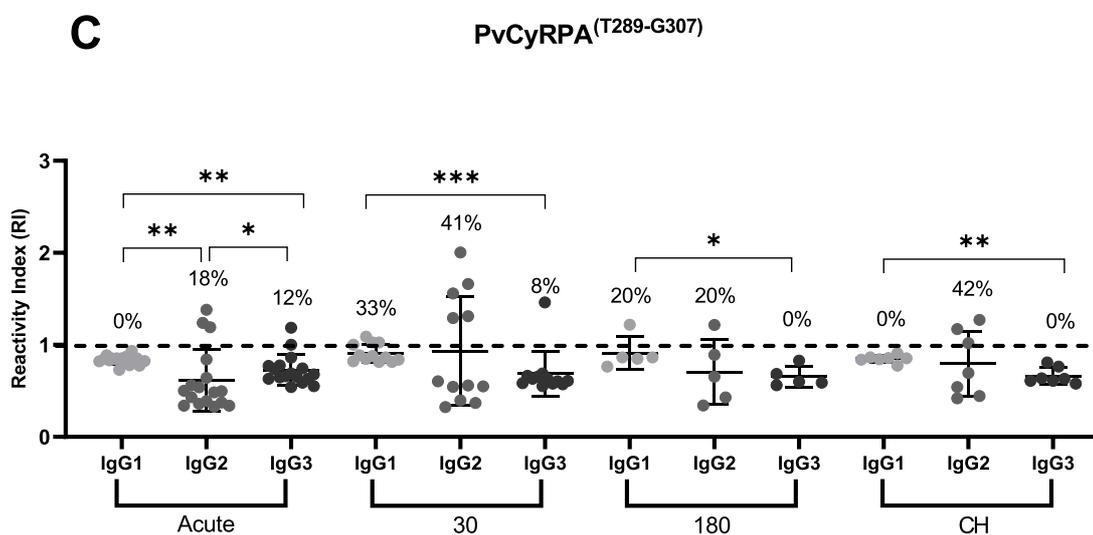
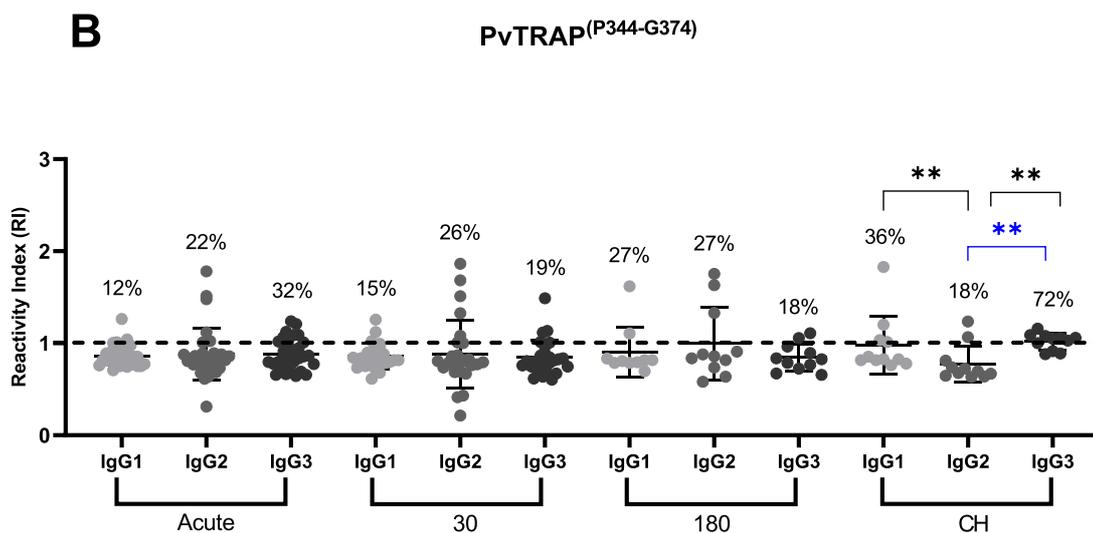
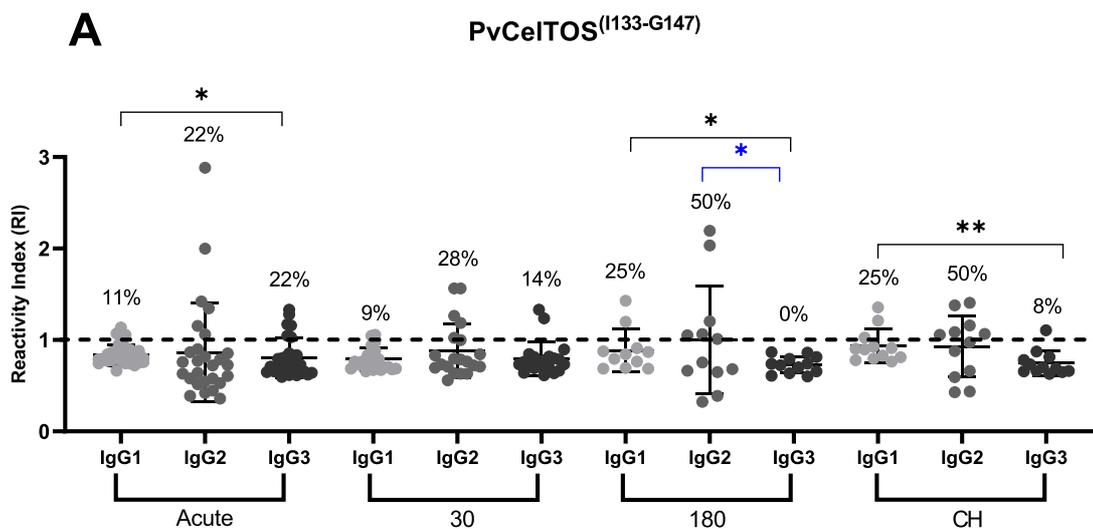


Figure 3. Response profile of IgG antibody subclasses (IgG1, IgG2, and IgG3) against PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374) and PvCyRPA^(T289-G307) in the acute and convalescent phases of *P. vivax*. The dashed line represents the cut-off that separates responders from non-responders. The horizontal line in the scatter plots represents the median RI value. Each sample was tested in duplicate by ELISA. Statistical significance of the frequency of responders at different points for each antigen was assessed using the Chi-square test with Fischer's post-test for multiple comparisons. Statistical significance of the RI observed at different points for each antigen was assessed using the Kruskal Wallis test with Mann-Whitney post-test for multiple comparisons ($P < 0.05$). The bars represent statistical differences between the groups, the black ones indicate the differences in the observed RI and the blue ones refer to the frequency of positive responders. 30 (Convalescent 30 days), 180 (Convalescent 180 days). (A) PvCelTOS^(I133-G147) n acute = 27, n 30 = 21, n 180 = 12, n CH = 12. (B) PvTRAP^(P344-G374) – n acute = 31, n 30 = 26, n 180 = 11, n CH = 11. (C) PvCyRPA^(T289-G307) – n acute = 16, n 30 = 12, n 180 = 5, n CH = 7.

3.3. IgG antibodies longevity and seroconversion profile throughout clinical follow-up

The seroconversion profile, as well as, the longevity of the naturally acquired antibodies for all peptides were also evaluated. To this, initially, were selected individuals who had blood samples collected during the acute malaria and 30 days after treatment.

For PvCelTOS^(I133-G147), of 38 selected individuals, 39% (n=15) had detected IgG antibodies during the acute phase. Of these, 67% (n=10) remained positive until day 30 of follow-up. Regarding negative individuals during the acute phase of infection (n=23), only 7 (30%) seroconverted until 30 days after treatment (Figure 4A).

Regarding PvTRAP^(P344-G374), a similar profile of longevity and seroconversion was observed. Specifically, of the 19 (n=38) individuals who had IgG antibodies detected during the acute phase of infection, 79% (n=15) remained positive for up to 30 days. On the other hand, of individuals without detectable anti-PvTRAP^(P344-G374) antibodies in the acute phase of infection, only 36% (n=7) seroconverted until day 30. Interestingly, for this peptide, the highest RIs were detected at point 30 of the study (Figure 4B).

Of the 38 individuals, whose antibody profile against the three selected peptides was evaluated during acute malaria and on the 30th day of convalescence, the lowest positivity rate was observed for PvCyRPA^(T289-G307). In this case, only 9 (23%) of the 38 individuals presented anti-PvCyRPA^(T289-G307) IgG in the acute phase of infection, with 4 of them (44%) being negative by the 30th day. Regarding the seroconversion profile, was observed that of the 29 individuals without antibodies against PvCyRPA^(T289-G307) in the acute phase of the disease, only 6 (20%) seroconverted until day 30 (Figure 4C).

Next, we selected 19 individuals who had serum samples collected during the clinical episode of malaria and ≥ 180 days after treatment to analyze the longevity of antibodies and seroconversion profile against the proteins of interest. From the data, it was observed that the frequency of responders in the acute phase of infection was similar for all proteins (47%, 52%, and 37% for PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374) and PvCyRPA^(T289-G307), respectively). However, the highest frequency of negativity was observed for PvCyRPA^(T289-G307) (71% or 5/7) followed by PvCelTOS^(I133-G147) (56% or 5/9) and PvTRAP^(P344-G374) (30% or 3/10). Similar seroconversion rate was observed for PvCyRPA^(T289-G307) (16% or 2/12), and

PvTRAP^(P344-G374) (22% or 2/9). The highest frequency of seroconversion was observed for PvCelTOS^(I133-G147) (60% or 6/10) (Figure 5).

Finally, we selected 11 individuals with serum samples collected and analyzed for all peptides in the acute and convalescence of 30 and 180 days (Figure 6). For PvCelTOS^(I133-G147), from five individuals who were positive at the acute phase, 60% (n=3) became negative at the end of the follow-up. Seroconversion was observed in 3 from 6 subjects without antibodies detectable during acute malaria, 50% (n=3) seroconverted and 40% (n=2) remained stable (Figure 6A).

For PvTRAP^(P344-G374) none of the IgG-positive individuals during acute malaria became negative during follow-up. At the same time, only one seroconversion was observed during follow-up with later negativation. The magnitude of antibody response were similar during the 30 and 180-day convalescence phase (Figure 6B).

Lastly, for PvCyRPA^(T289-G307), from the 27% (n=3) of individuals who were positive at the acute phase, 66% (n=2) became negative at the end of the follow-up, only 25% (n=2/8) seroconverted (Figure 6C).

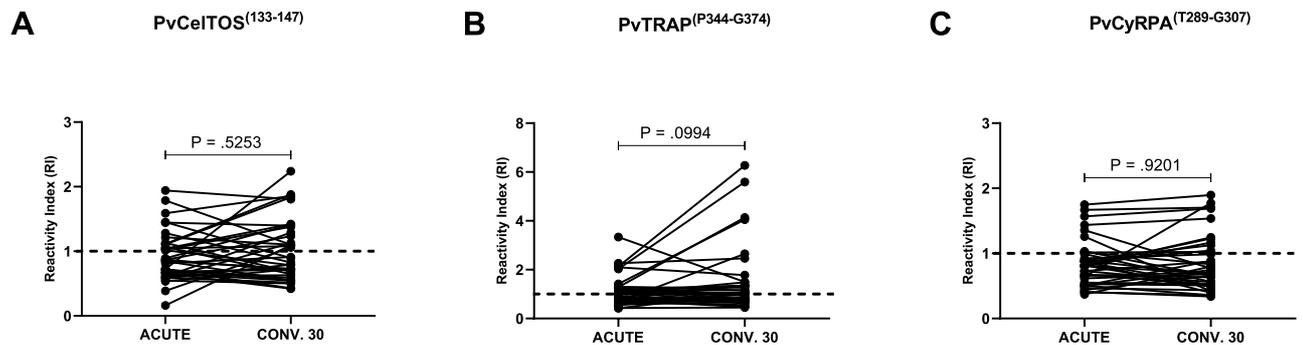


Figure 4. Dynamics of antibody response during acute and convalescent phase(30 dpi) of vivax malaria for PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374) and PvCyRPA^(T289-G307). The dashed line represents the cut-off that separates responders from non-responders. Each line with spheres at the ends represents an individual. All samples were tested in duplicates by ELISA. Statistical significances were tested the Wilcoxon test ($P < 0.05$). n= 38.

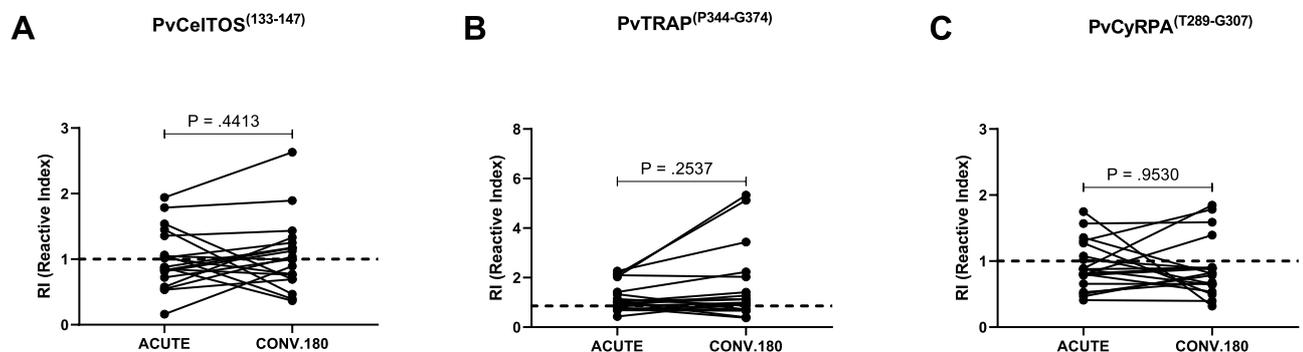


Figure 5. Dynamics of antibody response during acute and convalescent phase (180 dpi) of vivax malaria for PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374) and PvCyRPA^(T289-G307). The dashed line represents the cut-off that separates responders from non-responders. Each line with spheres at the ends represents an

individual. All samples were tested in duplicates by ELISA. Statistical significances were tested the Wilcoxon test ($P < 0.05$). $n = 19$.

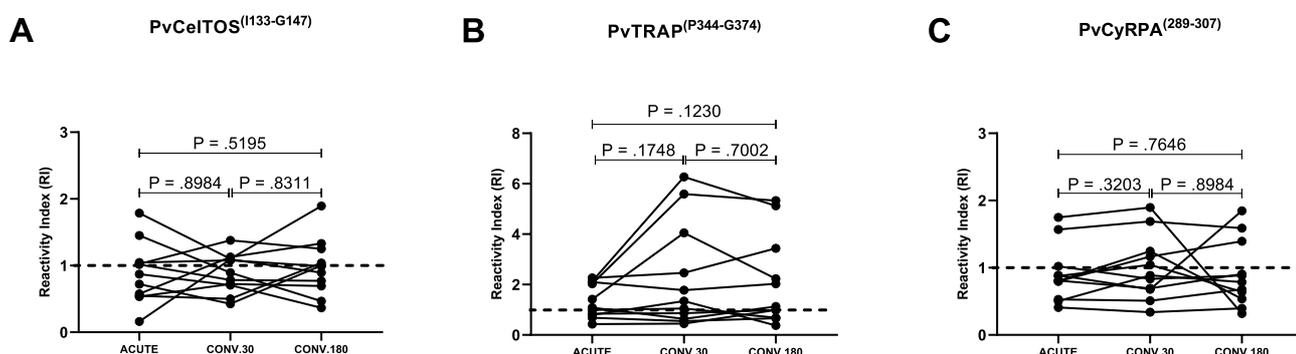


Figure 6. Dynamics of antibody response during acute and convalescent phase (30 and 180 dpi) of vivax malaria for PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374) and PvCyRPA^(T289-G307). The dashed line represents the cut-off that separates responders from non-responders. Each line with spheres at the ends represents an individual. All samples were tested in duplicates by ELISA. Statistical significances were tested the Wilcoxon test. $n = 11$.

3.4. Correlation with epidemiological and immunological parameters for IgM and IgG antibodies

We also analyzed the correlation among the patients' IR for both IgM and IgG, with a number of previous malaria, rate of circulating parasites, and time of exposure of the individual in an endemic area. As described below, independently of antigen, the magnitude of antibody response for IgM or IgG appears to be not influenced by any of parameters analyzed (Tables 1, 2 and 3).

Table 1. Correlation between the RI of the acute phase of the antigens PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374), and PvCyRPA^(T289-G307), with number of previous malarias. All samples were tested in duplicates. Statistical differences were calculated using Spearman's correlation for non-parametric data and Pearson's correlation for parametric data. $n = 56$.

| Peptides/Correlations | IgG | IgM |
|---------------------------------|----------------|---------------|
| PvTRAP ^(P344-G374) | $r = -0,05759$ | $r = -0,1642$ |
| | $p = 0,6943$ | $p = 0,2595$ |
| PvCelTOS ^(I133-G147) | $r = 0,1416$ | $r = -0,1794$ |
| | $p = 0,3317$ | $p = 0,2175$ |
| PvCyRPA ^(T289-G307) | $r = 0,06536$ | $r = -0,1372$ |
| | $p = 0,6555$ | $p = 0,3471$ |

Table 2. Correlation between the RI of the acute phase of the antigens PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374), and PvCyRPA^(T289-G307) with exposure time (years). All samples were tested in duplicates. Statistical differences were calculated using Spearman's correlation for non-parametric data and Pearson's correlation for parametric data. $n = 56$.

| Peptides/Correlations | IgG | IgM |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| PvTRAP ^(P344-G374) | r= -0,07877 p= 0,5827 | r= -0,2366 p= 0,0945 |
| PvCelTOS ^(I133-G147) | r= 0,05917 p= 0,6800 | r=-0,3035 p= 0,0304 |
| PvCyRPA ^(T289-G307) | r= 0,02747 p= 0,8482 | r= -0,1063 p= 0,4624 |

Table 3. Correlation between the RI of the acute phase of the antigens PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374), and PvCyRPA^(T289-G307) with parasitemia. All samples were tested in duplicates. Statistical differences were calculated using Spearman's correlation for non-parametric data and Pearson's correlation for parametric data. n= 56.

| Peptides/Correlations | IgG | IgM |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| PvTRAP ^(P344-G374) | r= 0,1972 p= 0,1451 | r= 0,2383 p= 0,0769 |
| PvCelTOS ^(I133-G147) | r= 0,1428 p= 0,2936 | r= 0,1873 p= 0,1669 |
| PvCyRPA ^(T289-G307) | r= 0,08225 p= 0,5467 | r= 0,06860 p= 0,6154 |

4. Discussion

P. vivax is the Plasmodium species with the biggest global distribution outside Sub-Saharan Africa [34], causing alarming socioeconomic losses [35,36]. Although the scientific community's interest in *P. vivax* infection is currently greater compared to what was seen decades ago, most malaria studies are still focused on understanding of falciparum malaria, the most lethal species in the world [37,38]. At least in part, the current interest of the scientific community in understanding vivax malaria, until then considered non-lethal, due to the recent occurrence of the severe cases and deaths associated with the infection, and the difficulties in controlling *P. vivax* compared to other species of human plasmodia [38-40], along with treatment failures observed around the world [41]. Although the development of an effective vaccine against *P. vivax* is considered an important strategy in combating this plasmodia parasite, the difficulty of its *in vitro* culture has been considered an important obstacle to the advancement of research [42]. Another important consideration about *P. vivax* is that just a few studies performed in countries of the African continent, Thailand and Brazil, address the half-life of antibodies, an important parameter for choosing vaccine candidates [43-46]. Therefore, our work aimed to evaluate the antibody response, at the epitope level, in individuals exposed to malaria infection during the acute and convalescent phases of *P. vivax* infection. From our knowledge, this is the first study where the dynamics of IgM and IgG antibodies and their subclasses against linear peptides of PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374) and PvCYRPA^(T289-G307) were analyzed up to six months after infection.

IgM is the first antibody to be induced during an infection, being quickly replaced by IgG after a few weeks during the immunological memory phase. As it is the antibody responsible for the first contact with a new pathogen, it does not appear in reinfections with homologue

parasites and, in this case, the pathogen is then eliminated by IgG produced by immunological memory cells [47]. Although it has not been associated with malaria infections for a long time, it has recently gained attention for showing evidence of its participation in reducing the risk of clinical disease in children [47-49]. In this study, the vast majority of participants (around 64%) have already undergone previous malaria but the primary infections did not impact the IgM response profile. The low frequencies of responders and low RI for IgM can be explained by a possible production of long-lasting IgM or even the production of memory IgM, as suggested in previous studies [50,51]. However, more studies are necessary to confirm the true role of IgM in individuals with more than one previous malaria case.

IgG antibody positivity was more significant in exoerythrocytic phase peptides, with the highest levels being observed for PvTRAP^(P344-G374). This high frequency, especially among individuals in the acute phase (57%), is contrary from the findings of Matos et. al. (2019) who, when researching anti-PvTRAP^(P344-G374) antibodies in individuals in the acute phase and residents of an endemic area in Acre, noticed that only 32% of subjects responded to this peptide, a difference of more than 25%. The high levels of RI also drew attention in this study; Matos et. al. (2019) studied the recombinant PvTRAP protein and obtained RIs ranging from 1.0 to 4.2 [23]. Here, we observed RIs for PvTRAP^(P344-G374) ranging from 1.0 to 6.2. PvTRAP^(P344-G374) is a peptide derived from the full-length PvTRAP protein, the high rates of reactivity observed here, in contrast to the findings of Matos et. al. (2019), can be explained due PvTRAP^(P344-G374) is a fragment of 30 amino acids of an entire protein and therefore, this fragment may be responsible for concentrating the highest RIs compared to other peptides derived from the same recombinant protein.

PvCelTOS^(I133-G147) did not demonstrate results as significant as PvTRAP^(P344-G374), but antibodies against this peptide were also observed. The results obtained in the study conducted by Rodrigues-da-Silva and collaborators (2017), showed that 18% of individuals living in an endemic area for malaria in Amazonas responded to the PvCelTOS recombinant protein, a frequency considered low. However, when this population was tested for the peptide PvCelTOS^(I133-G147), this frequency increased to 92%. However, our study shows that 48% of individuals in the acute phase and 52% of CH responded to PvCelTOS^(I133-G147). Regarding the RI, Rodrigues-da-Silva et.al. (2017), showed rates of responding individuals varying from 1.0 to approximately 3.5 [24], values close to those found here for individuals in the acute phase and CH (IR ranging from 1.0 to 2.4 and 2.3, respectively).

Regarding the IgG subclasses is known that IgG1 and IgG3, considered cytophilic [52], are normally the most abundant in individuals who have achieved a protective status against the clinical manifestations of the disease [53,54]. IgG1 is considered the most abundant subclass [55], being activated by T cells and strongly binding to the Fc γ portion, mediating the activation of phagocytes and complement fixation [56]. Together with IgG3, it is responsible for opsonic phagocytosis, and neutrophil-mediated death, inducing protection against clinical disease [57]. IgG3 also stands out for its high affinity for the Fc γ receptor, even greater than that of IgG1, on the surface of monocytes [58], on the other hand, its affinity for antigens is low [59]. In addition, it has a short half-life of approximately 7 days, compared to the other subclasses [60]. Besides, it has been suggested that IgG2, a non-cytophilic antibody, may

act as a protective antibody in in vitro functional invasion assays [61,62]. In this study, when the data on IgG subclasses were compared with the data from Matos et. al. (2019) was noticed differences between the responses profile of the recombinant protein PvTRAP and the peptide PvTRAP^(P344-G374). Although Matos et. al. (2019), as well as in this study, also present IgG1 as the subclass with the highest response, the frequency of individuals responding to the recombinant protein in the acute phase of the disease (68%) was significantly higher than the percentage seen here for PvTRAP^(P344-G374) (13%) (MATOS et. al., 2019). However, in the acute phase for PvTRAP^(P344-G374), IgG3 was the most predominant subclass, with 32% of positive responders. A similar profile of PvTRAP comparisons was observed for PvCelTOS^(I133-G147) when compared with the recombinant protein PvCelTOS. While the recombinant protein showed 66% of responders to IgG1 in its population, the peptide represented here showed 11% of responders in the acute phase and 25% of responders in the CH group [24]. The greater response of IgG1 to IgG3 in some peptides can be explained by the longer lifetime that IgG1 has about IgG3.

The most used method to evaluate naturally acquired or vaccine-induced immunity is to measure the level of antibody response of the individual naturally exposed to the infection or who has malaria at the beginning of the infection and during a segment period, through which various responses against malaria antigens were observed and associated with protection [63-65]. However, few studies around the world have investigated through long clinical follow-up, the naturally acquired immune responses using peptides from vaccine candidates proteins. In Brazil, for example, just one study developed by our group demonstrates that naturally acquired antibodies, as well as specific-antigen MBCs, can be detectable until at least six months after malaria clinical episode in rural Amazonians exposed to low levels of vivax malaria transmission [43]. Similar results were obtained in this study by analysis of half-life and seroconversion of IgG antibody recognizing PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374) and PvCyRPA^(T289-G307) during the follow-up of 30 and >180 days. For the PvTRAP^(P344-G374) peptide, we observed that in the segment from D0 to D30 we obtained 36% of seroconversion and from D0 to D180 22%. During a study with recombinant PvTRAP, Kosuwin et. al. (2018) analyzed the IgG antibody profile in 22 patients on days 0, 7, and 21 after infection. It was observed that since on day 0 six patients had antibodies against domain II of PvTRAP and 12 had antibodies to domain IV, on D7 there was 50% seroconversion to domain II and 62.5% to domain IV, on D21 6 of the 14 individuals who were negative on D0 became positive on domain II while all individuals who were negative on domain IV became positive [66]. Despite this, we can highlight that regardless of seroconversion rates, the antibodies response remain stable up to 180 days after infection.

Among the peptides analyzed here, PvCyRPA^(T289-G307) showed the lowest frequencies, which isn't a surprise since França and collaborators (2017), in the study in which they identified recombinant *P. vivax* proteins for the development of vaccines, showed that PvCyRPA, despite the low frequencies of antibodies, were capable of inducing protection [15, 67]. The response pattern to this antigen observed here is similar to that seen in the aforementioned study. The population studied here was also analyzed in the study conducted by Soares and collaborators (2019), where they also followed this population at days 0, 60, and 180 after the infection as well as the population of exposed individuals to investigate

the antibody response against two peptides from *P. vivax* erythrocytic phase: PvAMA-1^(S290-K307) and PvMSP9^(E795-A808). The authors observed that: for both PvAMA-1^(S290-K307) and PvMSP9^(E795-A808) the highest frequency of responders was observed 180 days after the infection, but the highest RI was observed in the acute phase [43]. In this study, although the analysis was also in the same population studied by Soares and collaborators (2019), when we compared the erythrocytic phase proteins presented in the mentioned study and PvCyRPA^(T289-G307), also from the erythrocytic phase, we did not notice the same pattern. PvCyRPA^(T289-G307) here presents the highest frequency in the acute phase and the highest reactivity index on D30, in addition, the exposed group here called cohabitants presented higher IRs than those seen on D30, something that was not seen in the mentioned study. Soares and collaborators (2019) also analyzed the segment on day 0 and day 30 to observe the longevity of the antibody response to the two peptides. 25% seroconversion to PvAMA-1^(S290-K307) and 40% seroconversion to PvMSP9^(E795-A808) were observed with no significant change being observed, which proves the longevity of IgG 180 after infection [43].

Calculating the correlations between immune response and epidemiological parameters is important to assess whether these factors can influence the dynamics of the disease in the populations studied and how this influence occurs. Here, no correlations were observed between the response to the evaluated peptides and the parameters as parasitemia, exposure time in endemic areas, and number of previous malaria. Rodrigues-da-Silva and collaborators (2017) in their study, already mentioned here, with the recombinant protein PvCelTOS, observed a positive correlation with the number of previous malaria ($r= 0.227$; $p= 0.047$), here we also observed a positive correlation for this same parameter when we compare the PvCelTOS^(I133-G147) fragment ($r= 0.1416$; $p= 0.3317$) [24]. For Matos and collaborators (2019), also mentioned here, no correlation was seen between the number of previous malaria cases and the response against the recombinant protein PvTRAP ($r= 0.013$; $p= 0.0832$), for the exposure time parameter, a positive correlation was observed ($r= 0.194$; $p= 0.001$) [23].

The great part of the differences presented here in comparison with the data present in the literature can be explained by the differences between peptide and recombinant protein, like the low availability of epitopes present in the peptides for immunological recognition [68]. The differences observed between peptides of the same phase of the cycle may be explained by the different localizations of the proteins in the parasite, PvAMA and PvMSP9 are surface proteins while PvCyRPA is a microneme protein. Furthermore, differences in study areas, population size, collection dates, and follow-up periods must also be taken into account. It is worth highlighting that data on population segments are rare, mainly in Brazil, and the data presented here for the convalescent phases of the disease related to the peptides PvTRAP^(P344-G374), PvCelTOS^(I133-G147) and PvCyRPA^(T289-G307) are novelty and can help to understand the dynamics of production and maintenance of antibody to this proteins by individuals living in the endemic area.

5. Conclusions

Overall, the data presented shows that all peptides studied were recognized specially by IgG antibody, which remained stable throughout 6 months of follow-up same in the absence of reinfection. Regarding

subclasses, IgG2, together with IgG3, was the most prevalent for all proteins, but its role in the protection need to be better investigated. Peptides can be, in the future, an alternative strategy to polypeptidic vaccine formulation.

Author Contributions: The following statements should be used “Conceptualization, K.K.G.S and J.L.C.J.; methodology, K.K.G.S, and J.L.C.J.; software, C.M.R.; validation, K.K.G.S, and J.L.C.J.; formal analysis, C.M.R., K.K.G.S, and J.L.C.J.; investigation, C.M.R; I.F.S.; A.S.M.; R.N.R.S.; writing—original draft preparation, C.M.R, J.L.C.J., and K.K.G.S.; writing—review and editing, C.M.R., M.U.F.; L.R.P-R, P.R.R.T., J.L.C.J. and K.K.G.S.; supervision, J.L.C.J. and K.K.G.S.; project administration, K.K.G.S.; funding acquisition, J.L.C.J. and K.K.G.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

Funding: This research was funded by the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* (FAPEMIG - Rede Mineira #00313-16 and APQ-1365-22), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq 310272/2022-0), and *Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas of the Universidade Federal de Juiz de Fora*. CMR was a recipient of a CAPES (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*) Master fellowship.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Juiz de Fora (CEP/UFJF) under protocol number 362.875 - 2013.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. All participants provided written informed consent.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this article

Acknowledgments: We would like to thank all subjects from the Acre and Rondônia States, Brazil, that agreed to participate in the study. We also thank Roberta Reis Soares, Pablo Secato Fontoura for assistance in collecting the samples.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this article.

Appendix A

Table A1: Patient’s profile. Data for continuous variables are reported as medians and interquartile ranges and compared with Kruskal-Wallis (three groups) or Mann-Whitney tests (two groups). Absolute number and proportion of males is compared with a chi-squared test.

| Characteristics | NEC (n = 20) | CH (n = 23) | AC (n = 56) | p-value |
|---|------------------|------------------|-----------------|---------|
| Age (y), median (IQR) | 26,5 (23.0-31.0) | 40.0 (23.0-60.0) | 34.5 (7.0-64.0) | .002 |
| Number (%) of males | 2 (10%) | 14 (60,87%) | 41 (73,22%) | <.0001 |
| Years of exposure to malaria | NA | 35.4 (8.0-60.0) | 29.5 (7.0-60.0) | .021 |
| Number of previous laboratory-confirmed malaria episodes, mean (SD) | NA | 2.1 (3.4) | 3.8 (5.4) | 0.31 |
| Time from least malaria episode, median (IQR) | NA | 6 (0-30.0) | 11.5 (0-20.0) | 0.74 |

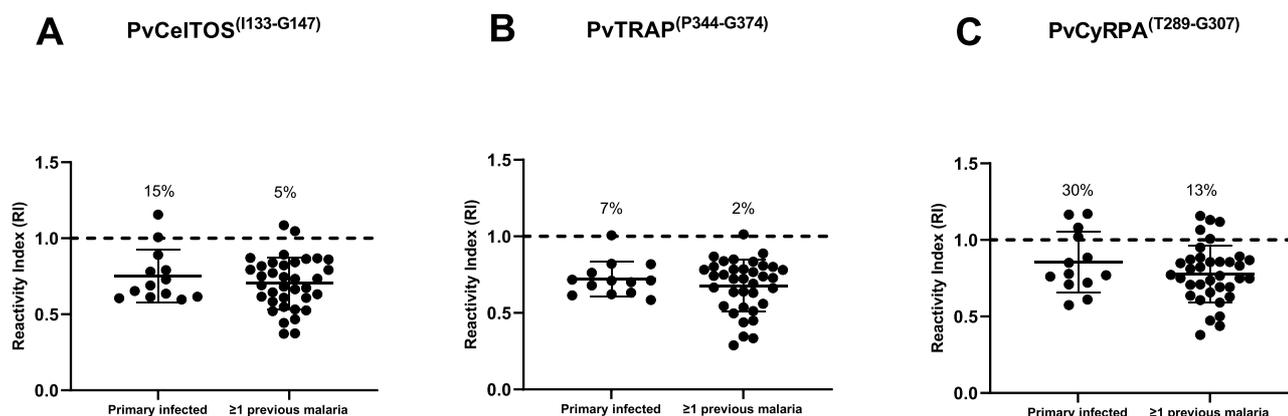


Figure A2: RI of primary infected individuals and more than 1 previous malaria individuals for PvCelTOS^(I133-G147), PvTRAP^(P344-G374) and PvCyRPA^(T289-G307) in the acute phase of *P. vivax* for IgM. The dashed line represents the cut-off that separates responders from non-responders. The horizontal line in the scatter plots represents the median RI value. Each sample was tested in duplicate by ELISA. Statistical significance of the RI observed at different points for each antigen was assessed using the Kruskal Wallis test with Mann-Whitney post-test for multiple comparisons ($p < 0.05$). The bars represent statistical differences between the groups. Ac: n= 56.

References

1. WHO. World Malaria Report 2023a. Available online: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023> (accessed on 15 January 2024).
2. De Alvarenga, D.A.M.; Rodrigues, D.F.; Culleton, R.; De Pina-Costa, A.; Bianco Jr., C.B.; Silva, S.; Nunes, A.J.L.; De Souza Jr., J.C.; Hirano, Z.M.B.; Moreira, S.B.; Pissinatti, A.; De Abreu, F.V.S.; Areas, A.L.L.; Lourenço-De-Oliveira, R.; Zalis, M.G.; Ferreira-Da-Cruz, M.F.; Brasil, P.; Daniel-Ribeiro, C.T.; De Brito, C.F.A. An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. *Sci. Rep.* **2018**, *8*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18216-x>.
3. WHO. Health topics – Malaria 2023. Available online: https://www.who.int/health-topics/malaria#tab=tab_1 (accessed on 20 January 2024).
4. Cogswell, F.B. The Hypnozoite And Relapse In Primate Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* **1992**, *5*, 26-35. <https://doi.org/10.1128/cmr.5.1.26>.
5. Escalante, A.E.; Cepeda A.S.; Pacheco, M.A. Why *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* are so different? A tale of two clades and their species diversities. *Malar. J.* **2022**, *21*. <https://doi.org/10.1186/s12936-022-04130-9>.
6. Olbadian III, N.; Meibalan, E.; As, J.M.; Ma, S.; Clarck, M.A.; Mejia, P.; Barros, R.R.M.; Otero, W.; Ferreira, M.U.; Mitchell, J.R.; Milner, D.A.; Huttenhower, C.; Wirth, D.F.; Duraisingh, M.T.; Wellems, T.E.; Marti, M. Bone Marrow Is A Major Parasite Reservoir In *Plasmodium Vivax* Infection. *mBio.* **2018**, *9*. <https://doi.org/10.1128/mbio.00625-18>.
7. Rabinovich, R.N.; Drakeley, C.; Djimde, A.A.; Hall, F.; Hay, S.I.; Hemingway, J.; Kaslow, D.C.; Noor, A.; Okumu, F.; Steketeel, R.; Tanner, M.; Wells, T.N.C.; Whittaker, M.A.; Winzeler, E.A.; Wirth, D.F.; Whitfield, K.; Alonso, P.L. malERA: An Updated Research Agenda For Insecticide And Drug Resistance In Malaria Elimination And Eradication. *PLoS Med.* **2017**, *14*. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002450>.
8. De Jong, R.M.; Tebeje, S.K.; Meerstein-Kessel, L.; Tadesse, F.G.; Jore, M.M.; Stone, W.; Bousema, T. Immunity Against Sexual Stage *Plasmodium Falciparum* And *Plasmodium Vivax* Parasites. *Immunol. Rev.* **2019**, *293*, 190-215. <https://doi.org/10.1111/imr.12828>.
9. Duffy, P. E.; Gorres, J. P. Malaria Vaccines Since 2000: Progress, Priorities, Products. *NPJ Vaccines.* **2020**, *8*. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0196-3>.
10. Syed, Y.Y. Rts,S/As01 Malaria Vaccine (Mosquirix®): A Profile Of Its Use. *Drugs Ther. Perspect.* **2022**, *38*, 373-381. <https://doi.org/10.1007/s40267-022-00937-3>.

11. Who. Malaria Vaccine: Who Position Paper – March 2022. Available online: <https://www.who.int/publications/I/item/who-wer9709-61%E2%80%93380> (accessed on 21 January 2024).
12. Skwarczynski, M.; Chandrudu, S.; Rigau-Planella, B.; Islam, M.T.; Cheong, Y.S.; Liu, G.; Wang, X.; Toth, I.; Hussein, W.M. Progress In The Development Of Subunit Vaccines Against Malaria. *Vaccines*. **2020**, *8*. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030373>.
13. Alves, E.; Salman, A.M.; Leoratti, F.; Lopez-Camacho, C.; Viveros-Sandoval, M.E.; Lall, A.; El-Turabi, A.; Bachmann, M.F.; Hill, A.V.S.; Janse, C.J.; Khan, S.M.; Reyes-Sandoval, A. Evaluation Of *Plasmodium Vivax* Cell-Traversal Protein For Ookinetes And Sporozoites As A Preerythrocytic *P. Vivax* Vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* **2017**, *24*. <https://doi.org/10.1128/CVI.00501-16>.
14. Bauza, K.; Malinauskas, T.; Pfander, C.; Anar, B.; Jones, Y.; Bilker, O.; Hill, A.V.S.; Reyes-Sandoval, A. Efficacy Of A *Plasmodium Vivax* Malaria Vaccine Using Chad63 And Modified Vaccinia Ankara Expressing Thrombospondin-Related Anonymous Proteins Assessed With Transgenic *Plasmodium Berghei* Parasites. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 1277-1286. <https://doi.org/10.1128/iai.01187-13>.
15. França, C.T.; Hostetler, J.B.; Sharma, S.; White, M.T.; Lin, E.; Kiniboro, B.; Waltmann, A.; Darcy, A.W.; Suen, C.S.N.L.W.; Siba, P.; King, C.L.; Rayner, J.C.; Fairhurst, R.M.; Mueller, I. An Antibody Screen Of A *Plasmodium Vivax* Antigen Library Identifies Novel Merozoite Proteins Associated With Clinical Protection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004639>.
16. Pirahmadi, S.; Zakeri, S.; Mehri, A.A.; Djadid, N.D.; Raz, A.A.; Sani, J.J.; Abbasi, R.; Ghorbanzadeh, Z. Cell-Traversal Protein For Ookinetes And Sporozoites (Celts) Formulated With Potent Tlr Adjuvants Induces High-Affinity Antibodies That Inhibit *Plasmodium Falciparum* Infection In *Anopheles Stephensi*. *Malar. J.* **2019**, *18*. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2773-3>.
17. Kariu, T.; Ishino, T.; Yano, K.; Chinzei, Y.; Yuda, M. Celts, A Novel Malarial Protein That Mediates Transmission To Mosquito And Vertebrate Hosts. *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 1369-1379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05024.x>.
18. Kappe, S.; Bruderer, T.; Gantt, S.; Fujioka, H.; Nussenzweig, V.; Ménard, R. Conservation Of A Gliding Motility And Cell Invasion Machinery In Apicomplexan Parasites. *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 937-943. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.5.937>
19. Kosuwini, R.; Putaporntip, C.; Tachibana, H.; Jongwutiwes, S. Spatial Variation In Genetic Diversity And Natural Selection On The Thrombospondin-Related Adhesive Protein Locus Of *Plasmodium Vivax* (PvTRAP). *PLoS One*. **2014**, *9*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110463>.
20. Müller, M.-H.; Reckmann, I.; Hollingdale, M.R.; Bujard, H.; Robson, K.J.H.; Crisanti, A. Thrombospondin Related Anonymous Protein (TRAP) Of *Plasmodium Falciparum* Binds Specifically To Sulfated Glycoconjugates And To Hepg2 Hepatoma Cells Suggesting A Role For This Molecule In Sporozoite Invasion Of Hepatocytes. *EMBO J.* **1993**, *12*, 2881-2889, 1993. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05950.x>.
21. Sinnis, P.; Sim, K.L. Cell Invasion By The Vertebrate Stages Of *Plasmodium*. *Trends Microbiol.* **1997**, *5*, 52-58. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)84657-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)84657-4).
22. Favuzza, P.; Guffarts, E.; Tamborini, M.; Scherer, B.; Dreyer, A.M.; Rufer, A.C.; Erny, J.; Hoernschemeyer, J.; Thoma, R.; Schmid, G.; Gsell, B.; Lamelas, A.; Benz, J.; Joseph, C.; Matile, H.; Pluschke, G.; Rudolph, M.G. Structure Of The Malaria Vaccine Candidate Antigen CyRPA And Its Complex With A Parasite Invasion Inhibitory Antibody. *Elife*. **2017**, *6*. <https://doi.org/10.7554/eLife.20383>.
23. Matos, A.S.; Rodrigues-Da-Silva, R.N.; Soares, I.F.; Baptista, B.O.; De Souza, R.M.; Bitencourt-Chaves, L.; Totino, P.R.R.; Sánchez-Arcila, J.C.; Daniel-Ribeiro, C.T.; López-Camacho, C.; Reyes-Sandoval, A.; Pratt-Riccio, L.R.; Lima-Junior, J.C. Antibody Responses Against *Plasmodium Vivax* TRAP Recombinant And Synthetic Antigens In Naturally Exposed Individuals From The Brazilian Amazon. *Front. Immunol.*, **2019**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02230>.
24. Rodrigues-Da-Silva, R.N.; Soares, I.F.; Lopez-Camacho, C. Da Silva, J.H.M.; Perce-Da-Silva, D.S.; Têva, A.; Franco, A.M.R.; Pinheiro, F.G.; Chaves, L.B.; Pratt-Riccio, L.R.; Reyes-Sandoval, A.; Banic, D.M.; Lima-Junior, J.C. *Plasmodium Vivax* Cell-Traversal Protein For Ookinetes And Sporozoites: Naturally Acquired Humoral Immune Response And B-Cell Epitope Mapping In Brazilian Amazon Inhabitants. *Front. Immunol.* **2017**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00077>.
25. Lestari, C.S.W.; Novientri, G. Advantages Of Yeast-Based Recombinant Protein Technology As Vaccine Products Against Infectious Diseases. *Iop Conf. Ser.* **2021**, *913*. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/913/1/012099>.
26. Arora, N.; Anbalagan, L.C.; Pannu, A.K. Towards Eradication Of Malaria: Is The Who's RTS,S/AS01 Vaccination Effective Enough?. *Risk Manag. Healthc. Policy.* **2021**, *14*, 1033-1039, 2021. <https://doi.org/10.2147/RMHP.S219294>.
27. Laurens, M.B. RTS,S/AS01 Vaccine (Mosquirix™): An Overview. *Hum. Vaccin. Immunother.* **2020**, *16*, 480-489. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1669415>.

28. Aderinto, N.; Olatunji, G.; Kokori, E.; Sikirullahi, S.; Aboje, J.E.; Ojabo, R.A Perspective On Oxford's R21/Matrix-M™ Malaria Vaccine And The Future Of Global Eradication Eforts. *Malar. J.* **2024**, *23*. <https://doi.org/10.1186/s12936-024-04846-w>.
29. Pollet, J.; Chen, W-H.; Strych, U. Recombinant Protein Vaccines, A Proven Approach Against Coronavirus Pandemics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *170*, 71-82. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.001>.
30. Yepes-Pérez, Y.; López, C.; Suárez, C.F.; Patarroyo, M.A. *Plasmodium Vivax* Pv12 B-Cell Epitopes And Hla-Drβ1-Dependent T-Cell Epitopes In Vitro Antigenicity. *Plos One.* **2018**, *13*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203715>.
31. Soares, R.R.; Cunha, C.F.; Ferraz-Nogueira, R.; Marins-Dos-Santos, A.; Rodrigues-Da-Silva, R.N.; Soares, I.S.; Lima-Junior, J.C.; Bertho, A.L.; Ferreira, M.U.; Scopel, K.K.G. Apical Membrane Protein 1-Specific Antibody Profile And Temporal Changes In Peripheral Blood B-Cell Populations In *Plasmodium Vivax* Malaria. *Parasite Immunol.* **2019**, *41*. <https://doi.org/10.1111/pim.12662>.
32. Cohen, S.; Butcher, G.A.; Mitchell, G.H. Mechanisms Of Immunity To Malaria. *Bull. World Health Organ.* **1974**, *50*, 251-257.
33. Wipasa, J.; Elliott, S.; Xu, H.; Good, M.F. Immunity To Asexual Blood Stage Malaria And Vaccine Approaches. *Immunol. Cell Biol.* **2002**, *80*, 401-414. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2002.01107.x>.
34. Battle, K.E.; Lucas, T.C.D.; Nguyen, M.; Howes, R.E.; Nandi, A.K.; Twohig, K.A.; Pfeiffer, D.A.; Cameron, E.; Rao, P.C.; Casey, D.; Gibson, H.S.; Rozier, J.A.; Dalrymple, U.; Keddie, S.H.; Collins, E.L.; Harris, J.R.; Guerra, C.A.; Thorn, M.P.; Bisanzio, D.; Fullman, N.; Huynh, C.K.; Kulikoff, X.; Kutz, M.J.; Lopez, A.D.; Mokdad, A.H.; Naghavi, M.; Nguyen, G.; Shackelford, K.A.; Vos, T.; Wang, H.; Lim, S.S.; Murray, C.J.L.; Price, R.N.; Baird, J.K.; Smith, D.L.; Bhatt, S.; Weiss, D.J.; Hay, S.I.; Gething, P.W. Mapping The Global Endemicity And Clinical Burden Of *Plasmodium Vivax*, 2000–17: A Spatial And Temporal Modelling Study. *Lancet*, **2019**, *394*, 332-343. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31096-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31096-7).
35. Price, R.N.; Commons, R.J.; Battle, K.E.; Thriemer, K.; Mendis, K. *Plasmodium Vivax* In The Era Of The Shrinking *P. Falciparum* Map. *Trends Parasitol.* **2020**, *36*, 560-570. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.03.009>.
36. Tefera, D.R.; Sinkie, S.O.; Daka, D.W. Economic Burden Of Malaria And Associated Factors Among Rural Households In Chewaka District, Western Ethiopia. *Clinicoecon. Outcomes Res.* **2020**, *12*, 141-152. <https://doi.org/10.2147/CEOR.S241590>.
37. Kochar, D.K.; Saxena, V.; Singh, N.; Kochar, S.K.; Kumar, S.V.; Das, A. *Plasmodium Vivax* Malaria. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 132-134. <https://doi.org/10.3201/eid1101.040519>.
38. Price, R.N.; Tjitra, E.; Guerra, C.A.; Yeung, S.; White, N.J.; Anstey, N.M. Vivax Malaria: Neglected And Not Benign. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77*, 79-87, 2007.
39. Douglas, N.M.; Anstey, N.M.; Buffet, P.A.; Poespoprodjo, J.R.; Yeo, T.W.; White, N.J.; Price, R.N. The Anaemia Of *Plasmodium Vivax* Malária. *Malar. J.* **2012**, *11*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-135>.
40. Naing, C.; Whittaker, M.A.; Wai, V.N.; Mak, J.W. Is *Plasmodium Vivax* Malaria A Severe Malaria?: A Systematic Review And Meta-Analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003071>.
41. Garrido-Cardenas, J.A.; Cebrián-Carmona, J. González-Cerón, L.; Manzano-Agugliaro, F.; Mesa-Valle, C. Analysis Of Global Research On Malaria And *Plasmodium Vivax*. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2019**, *16*. <https://doi.org/10.3390/ijerph16111928>.
42. Arévalo-Herrera, M.; Chitnis, C.; Herrera, S. Current Status Of *Plasmodium Vivax* Vaccine. *Hum. Vaccin.* **2010**, *6*, 124-132. <https://doi.org/10.4161/hv.6.1.9931>.
43. Soares, R.R.; Nakaie, C.R.; Rodrigues-da-Silva, R.N.; Da Silva, R.L.; Lima-Junior, J.C.; Scopel, K.K.G. Main B-cell epitopes of PvAMA-1 and PvMSP-9 are targeted by naturally acquired antibodies and epitope-specific memory cells in acute and convalescent phases of vivax malaria. *Parasite Immunol.* **2020**, *42*. <https://doi.org/10.1111/pim.12705>.
44. Druilhe, P.; Pradier, O.; Marc, J.P.; Miltgen, F.; Mazier, D.; Parent, G. Levels Of Antibodies To *Plasmodium Falciparum* Sporozoite Surface Antigens Reflect Malaria Transmission Rates And Are Persistent In The Absence Of Reinfection. *Infect. Immun.* **1986**, *53*, 393-397. <https://doi.org/10.1128/iai.53.2.393-397.1986>.
45. Wipasa, J.; Suphavitai, C.; Okell, L.C.; Cook, J.; Corran, P.H.; Thaikla, K.; Liwensaree, W.; Riley, E.M.; Hafalla, J.C.R. Long-Lived Antibody And B Cell Memory Responses To The Human Malaria Parasites *Plasmodium Falciparum* And *Plasmodium Vivax*. *Plos Pathog.* **2010**, *6*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000770>.
46. Braga, E.M.; Fontes, C.J.; Krettli, A.U. Persistence Of Humoral Response Against Sporozoite And Blood-Stage Malaria Antigens 7 Years After A Brief Exposure To *Plasmodium Vivax*. *J. Infect. Dis.* **1998**, *177*, 1132-1135. <https://doi.org/10.1086/517412>.
47. Boyle, M.J.; Chan, J.A.; Handayani, I.; Reiling, L.; Feng, G.; Hilton, A.; Kurtovic, L.; Oyong, D.; Piera, K.A.; Barber, B.E.; William, T.; Eisen, D.P.; Minigo, G.; Langer, C.; Drew, D.R.; Rivera, F.L.; Amante, F.H.; Williams, T.N.; Kinyanjui, S.; Marsh, K.; Doolan, D.L.; Engwerda, C.; Fowkes, F.J.I.; Grigg, M.J.; Mueller,

- I.; Mccarthy, J.S.; Anstey, N.M.; Beeson, J.G. IgM In Human Immunity To *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Sci. Ad.* **2019**, *5*. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax4489>.
48. Bohannon, C.; Powers, R.; Satyabhama, L.; Cui, A.; Tipton, C.; Michaeli, M.; Skountzou, I.; Mittler, R.S.; Kleinstein, S.H.; Mehr, R.; Lee, F.E.-H.; Sanz, I.; Jacob, J. Long-Lived Antigen-Induced IgM Plasma Cells Demonstrate Somatic Mutations And Contribute To Long-Term Protection. *Nat. Commun.* **2016**, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms11826>.
 49. De Assis, G.M.P.; De Alvarenga, D.A.M.; Souza, L.B.; Sánchez-Arcila, J.C.; Silva, E.F.; De Pina-Costa, A.; Gonçalves, G.H.P.; Junior, J.C.S.; Nunes, A.J.D.; Pissinatti, A.; Moreira, S.B.; Torres, L.M.; Costa, H.L.; Tinoco, H.P.; Pereira, V.S.; Soares, I.S.; De Sousa, T.N.; Ntumngia, F.B.; Adams, J.H.; Kano, F.S.; Hirano, Z.M. ; Pratt-Riccio, L.R.; Daniel-Ribeiro, C.T.; Ferreira, J.O.; Carvalho, L.H.; De Brito, C.F.A. IgM Antibody Responses Against *Plasmodium* Antigens In Neotropical Primates In The Brazilian Atlantic Forest. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2023**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1169552>.
 50. Walker, M.R.; Knudsen, A.S.; Partey, F.D.; Bassi, M.R.; Frank, A.M.; Castberg, F.C.; Sarbah, E.W.; Ofori, M.F.; Hviid, L.; Barfod, L. Acquisition And Decay Of IgM And IgG Responses To Merozoite Antigens After *Plasmodium Falciparum* Malaria In Ghanaian Children. *Plos One*, **2020**, *15*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243943>.
 51. Krishnamurthy, A.T.; Thouvenel, C.D.; Portugal, S.; Keitany, G.J.; Kim, K.S.; Holder, A.; Crompton, P.D.; Rawlings, D.J.; Pepper, M. Somatically Hypermutated *Plasmodium*-Specific IgM+ Memory B Cells Are Rapid, Plastic, Early Responders Upon Malaria Rechallenge. *Immunity* **2016**, *45*, 402-414. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.014>.
 52. Pinto, A.Y.N.; Ventura, A.M.R.S.; De Souza, J.M. IgG Antibody Response Against *Plasmodium Vivax* In Children Exposed To Malaria Before And After Specific Treatment. *J. Pediatr.* **2001**, *77*, 299-306. <https://doi.org/10.2223/jped.238>.
 53. Oeuvray, C.; Bouharoun-Tayoun, H.; Gras-Masse, H. Bottius, E.; Kaidoh, T.; Aikawa, M.; Filgueira, M.-C.; Tartar, A.; Druilhe, P. Merozoite Surface Protein-3: A Malaria Protein Inducing Antibodies That Promote *Plasmodium Falciparum* Killing By Cooperation With Blood Monocytes. *Blood.* **1994**, *84*, 1594-1602. <https://doi.org/10.1182/blood.V84.5.1594.1594>.
 54. Bouharoun-Tayoun, H.; Druilhe, P. *Plasmodium Falciparum* Malaria: Evidence For An Isotype Imbalance Which May Be Responsible For Delayed Acquisition Of Protective Immunity. *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 1473-1481. <https://doi.org/10.1128/iai.60.4.1473-1481.1992>.
 55. Vidarsson, G.; Dekkers, G.; Rispens, T. IgG Subclasses And Allotypes: From Structure To Effector Functions. *Front. Immunol.* **2014**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>.
 56. França, C.T.; He, W.-Q.; Gruszczyk, J.; Lim, N.T.Y. Lin, E.; Kiniboro, B.; Siba, P.M.; Tham, W.-H.; Mueller, I. *Plasmodium Vivax* Reticulocyte Binding Proteins Are Key Targets Of Naturally Acquired Immunity In Young Papua New Guinean Children. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005014>.
 57. Fan, L.; Xia, J.; Shen, J.; Fang, Q.; Xia, H.; Zheng, M.; Han, J.-H.; Han, E.-T.; Wang, B.; Xu, Y. An Erythrocyte Membrane-Associated Antigen, Pvtrag-26 Of *Plasmodium Vivax*: A Study Of Its Antigenicity And Immunogenicity. *Front. Public Health.* **2020**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00148>.
 58. Changrob, S.; Wang, B.; Han, J.-H.; Lee, S.-K.; Nyunt, M. H.; Lim, C. S.; Tsuboi, T.; Chootong, P.; Han, E.-T. Naturally-Acquired Immune Response Against *Plasmodium Vivax* Rhoptry Associated Membrane Antigen. *Plos One*, **2016**, *11*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148723>.
 59. Dobaño, C.; Santano, R.; Vidal, M.; Jiménez, A.; Jairoce, C.; Ubillos, I.; Dosoo, D.; Aguilar, R.; Williams, N.A.; Díez-Padriza, N.; Ayestaran, A.; Valim, C.; Asante, K.P.; Owusu-Agyei, S.; Lanar, D.; Chauhan, V.; Chitnis, C.; Dutta, S.; Angov, E.; Gamain, B.; Coppel, R.L.; Beeson, J.G.; Reiling, L.; Gaur, D.; Cavanagh, D.; Gyan, B.; Nhabomba, A.J.; Campo, J.J.; Moncunil, G. Differential Patterns Of IgG Subclass Responses To *Plasmodium Falciparum* Antigens In Relation To Malaria Protection And RTS,S Vaccination. *Front. Immunol.* **2019**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00439>.
 60. Morell, A.; Terry, W.D.; Waldmann, T.A. Metabolic Properties Of IgG Subclasses In Man. *J. Clin. Invest.* **1970**, *49*, 673-680. <https://doi.org/10.1172/JCI106279>.
 61. Aucan, C.; Traoré, Y.; Tall, F.; Nacro, B.; Troré-Leroux, T.; Fumoux, F.; Rihet, P. High Immunoglobulin G2 (IgG2) And Low IgG4 Levels Are Associated With Human Resistance To *Plasmodium Falciparum* Malaria. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 1252-1258. <https://doi.org/10.1128/iai.68.3.1252-1258.2000>.
 62. Cheng, Y.; Wang, B.; Changrob, S.; Han, J.-H.; Sattabongkot, J.; Há, K.-S.; Chootong, P.; Lu, F.; Cao, J.; Nyunt, M.H.; Park, W.S.; Hong, S.-H. Lim, C.S.; Tsuboi, T.; Han, E.-T. Naturally Acquired Humoral And Cellular Immune Responses To *Plasmodium Vivax* Merozoite Surface Protein 8 In Patients With *P. Vivax* Infection. *Malar. J.* **2017**, *16*. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1837-5>.
 63. Kinyanjui, S.M.; Bejon, P.; Osier, F.H.; Bull, P.C.; Marsh, K. What You See Is Not What You Get: Implications Of The Brevity Of Antibody Responses To Malaria Antigens And Transmission

- Heterogeneity In Longitudinal Studies Of Malaria Immunity. *Malar. J.* **2009**, *8*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-242>.
64. Okech, B.A.; Corran, P.H.; Todd, J.; Joyson-Hicks, A.; Uthaipibull, C.; Egwang, T.G.; Holder, A.A.; Riley, E.M. Fine Specificity Of Serum Antibodies To *Plasmodium Falciparum* Merozoite Surface Protein, PfMSP-119, Predicts Protection From Malaria Infection And High-Density Parasitemia. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 1557-1567. <https://doi.org/10.1128/iai.72.3.1557-1567.2004>.
 65. Osier, F.H.A.; Fegan, G.; Polley, S.D.; Murungi, L.; Verra, F.; Tetteh, K.K.A.; Lowe, B.; Mwangi, T.; Bull, P.C.; Thomas, A.W.; Cavanagh, D.R.; McBride, J.S.; Lanar, D.E.; Mackinnon, M.J.; Conway, D.J.; Marsh, K. Breadth And Magnitude Of Antibody Responses To Multiple *Plasmodium Falciparum* Merozoite Antigens Are Associated With Protection From Clinical Malaria. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 2240-2248. <https://doi.org/10.1128/iai.01585-07>.
 66. Kosuwini, R.; Feng, M.; Makiuchi, T.; Putaporntip, C.; Tachibana, H.; Jongwutiwes, S. Naturally Acquired IgG Antibodies To Thrombospondin-Related Anonymous Protein Of *Plasmodium Vivax* (PvTRAP) In Thailand Predominantly Elicit Immunological Cross-Reactivity. *Trop. Med. Int. Health.* **2018**, *23*, 923-933. <https://doi.org/10.1111/tmi.13083>.
 67. França, C.T.; White, M.T.; He, W.-Q.; Hostetler, J.B.; Brewster, J.; Frato, G.; Malhotra, I.; Gruszczyk, J.; Huon, C.; Lin, E.; Kiniboro, B.; Yadava, A.; Siba, P.; Galinski, M.R.; Healer, J.; Chitnis, C.; Cowman, A.F.; Takashima, E.; Tsuboi, T.; Tham, W.-H.; Fairhurst, R.M.; Rayner, J.C.; King, C.L.; Mueller, I. Identification Of Highly-Protective Combinations Of *Plasmodium Vivax* Recombinant Proteins For Vaccine Development. *Elife.* **2017**, *6*. <https://doi.org/10.7554/eLife.28673>.
 68. Audran, R.; Cachat, M.; Lurati, F.; Soe, S.; Leroy, O.; Corradin, G.; Druilhe, P.; Spertini, F. Phase I Malaria Vaccine Trial With A Long Synthetic Peptide Derived From The Merozoite Surface Protein 3 Antigen. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 8017-8026. <https://doi.org/10.1128/iai.73.12.8017-8026.2005>.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, podemos observar o destaque que PvTRAP^(P344-G374) obteve em relação aos outros peptídeos, apresentando as maiores porcentagens e índices de reatividade, bem como a melhor estabilidade durante o segmento. PvCyRPA^(T289-G307), o único peptídeo de fase eritrocítica aqui analisado, apresentou baixas porcentagens e as menores quando comparado com os peptídeos de fase exoeritrocíticos, porém já foi relatado em outro estudo um bom desempenho da proteína recombinante PvCyRPA em baixas porcentagens.

Em relação as subclasses de IgG, as altas porcentagens de IgG2 foram uma surpresa especialmente por essa ser uma subclasse não citofílica e que geralmente indica a troca entre IgG1 e IgG3, porém também foram vistos bons níveis das subclasses citofílicas. Esse aumento da IgG2 pode ser explicado devido à natureza do antígeno, por ser apenas um fragmento de uma proteína inteira este pode estar contendo os altos níveis de IgG2, porém mais estudos são necessários para a confirmação dessa hipótese.

Já para IgM, apesar de estudos recentes apontarem uma possível contribuição dele na aquisição da imunidade clínica, o que vimos aqui condiz com a natureza do anticorpo, apresentado no início da infecção e com uma meia vida curta.

Apesar dos resultados promissores, este estudo apresentou algumas limitações, como a perda de pacientes ao longo do segmento e a impossibilidade de confirmar a não exposição ao parasito entre os segmentos, ou seja, ausência de novas picadas. O acompanhamento da resposta imune em indivíduos naturalmente expostos é importante para a identificação de possíveis candidatos vacinais bem como o entendimento do funcionamento da imunidade naturalmente adquirida nessas populações, sendo assim, mais estudos são necessários para reafirmar a manutenção da resposta contra esses peptídeos a longo prazo em mais populações naturalmente expostas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**: Elsevier Editora Ltda., 8ª edição, 2015, 1262 p.

ADERINTO, N.; OLATUNJI, G.; KOKORI, E.; SIKIRULLAHI, S.; ABOJE, J. E.; OJABO, R. A perspective on Oxford's R21/Matrix-M™ malaria vaccine and the future of global eradication efforts. **Malaria Journal**, v. 23, n. 16, 2024.

AIKAWA, M. Variations in structure and function during the life cycle of malarial parasites. **Bulletin of World Health Organization**, v. 55, n. 2-3, p. 137-156, 1977.

DE ALVARENGA, D. A. M.; RODRIGUES, D. F.; CULLETON, R.; DE PINA-COSTA, A.; BIANCO JR., C. B.; SILVA, S.; NUNES, A. J. L.; DE SOUZA JR., J. C.; HIRANO, Z. M. B.; MOREIRA, S. B.; PISSINATTI, A.; DE ABREU, F. V. S.; AREAS, A. L. L.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; ZALIS, M. G.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; BRASIL, P.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; DE BRITO, C. F. A. An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. **Scientific Reports**, v. 8, n. 86, 2018.

ALVES, E.; SALMAN, A. M.; LEORATTI, F.; LOPEZ-CAMACHO, C.; VIVEROS-SANDOVAL, M. E.; LALL, A.; EL-TURABI, A.; BACHMANN, M. F.; HILL, A. V. S.; JANSE, C. J.; KHAN, S. M.; REYES-SANDOVAL, A. Evaluation of *Plasmodium vivax* Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites as a preerythrocytic *P. vivax* Vaccine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 4, 2017.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MÉNARD, R. *Plasmodium vivax* Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites (CelTOS) functionally restricted regions are involved in specific host-pathogen interactions. **Nature Medicine**, v. 12, n. 2, 2006.

ANDRADE, R. P. A saúde em tempos de desenvolvimento: a campanha de erradicação da malária na Amazônia. **História Revista**, v. 20, n. 3, 2015.

ANDRÉS, C. M. C.; DE LA LASTRA, J. M. P.; JUAN, C. A.; PLOU, F. J.; PÉREZ-LEBEÑA, E. The role of reactive species on innate immunity. **Vaccines**, v. 10, n. 10, 2022.

ANGULO, I.; FRESNO, M. Cytokines in the pathogenesis of and protection against malaria. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1145-1152, 2002.

ARÉVALO-PINZÓN, G.; GARZÓN-OSPINA, D.; PULIDO, F. A.; BERMÚDEZ, M.; FORERO-RODRÍGUEZ, J.; RODRÍGUEZ-MESA, X. M.; REYES-GUARÍN, L. P.; SUÁREZ, C. F.; PATARROYO, M. A. *Plasmodium vivax* Cell Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites (CelTOS) functionally restricted regions are involved in specific host-pathogen interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. 119, 2020.

ARORA, N.; ANBALAGAN, L. C.; PANNU, A. K. Towards eradication of malaria: is the WHO's RTS,S/AS01 vaccination effective enough?. **Risk Management and Healthcare Policy**, v. 14, p. 1033-1039, 2021.

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

AUNIN, E.; BÖHME, U.; SANDERSON, T.; SIMONS, N. D.; GOLDBERG, T. L.; TING, N.; CHAPMAN, C. A.; NEWBOLD, C. I.; BERRIMAN, M.; REID, A. J. Genomic and transcriptomic evidence for descent from *Plasmodium* and loss of blood schizogony in *Hepaticystis* parasites from naturally infected red colobus monkeys. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 8, 2020.

AVILA, S. L. M.; GOLDBERG, A. C.; ARRUK, V. G.; MARIN, M. L.; GUILHERME, L.; KALIL, J.; FERREIRA, A. W. Immune responses to multiple antigen peptides containing T and B epitopes from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein of Brazilian individuals naturally exposed to malaria. **Parasite Immunology**, v. 23, n. 2, p. 103-108, 2001.

BARATA, R. C. B. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. **Caderno de Saúde Pública**, v. 11, n. 1, p. 128-136, 1995.

BATTLE, K. E.; LUCAS, T. C. D.; NGUYEN, M.; HOWES, R. E.; NANDI, A. K.; TWOHIG, K. A.; PFEFFER, D. A.; CAMERON, E.; RAO, P. C.; CASEY, D.; GIBSON, H. S.; ROZIER, J. A.; DALRYMPLE, U.; KEDDIE, S. H.; COLLINS, E. L.; HARRIS, J. R.; GUERRA, C. A.; THORN, M. P.; BISANZIO, D.; FULLMAN, N.; HUYNH, C. K.; KULIKOFF, X.; KUTZ, M. J.; LOPEZ, A. D.; MOKDAD, A. H.; NAGHAVI, M.; NGUYEN, G.; SHACKELFORD, K. A.; VOS, T.; WANG, H.; LIM, S. S.; MURRAY, C. J. L.; PRICE, R. N.; BAIRD, J. K.; SMITH, D. L.; BHATT, S.; WEISS, D. J.; HAY, S. I.; GETTING, P. W. Mapping the global endemicity and clinical burden of *Plasmodium vivax*, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. **Lancet**, v. 394, n. 332, p. 43, 2019.

BAUZA, K.; MALINAUSKAS, T.; PFANDER, C.; ANAR, B.; JONES, E. Y.; BILLKER, O.; HILL, A. V. S.; REYES-SANDOVAL, A. Efficacy of a *Plasmodium vivax* malaria vaccine using ChAd63 and modified vaccinia Ankara expressing Thrombospondin-Related Anonymous Protein as assessed with transgenic *Plasmodium berghei* parasites. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1277-1286, 2014.

BECK, J. R.; HO, C-M. Transport mechanisms at the malaria parasite-host cell interface. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 4, 2021.

BEESON, J. G.; KURTOVIC, L.; DOBAÑO, C.; OPI, D. H.; CHAN, J-A.; FENG, C.; GOOD, M. F.; REILING, L.; BOYLE, M. J. Challenges and strategies for developing efficacious and long-lasting malaria vaccines. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 474, 2019.

BOUALAM, M. A.; PRADINES, B.; DRANCOURT, M.; BARBIERI, R. Malaria in Europe: a historical perspective. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 2021.

BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n. 2, p. 377-410, 2011.

BOYLE, M. J.; CHAN, J. A.; HANDAYUNI, I.; REILING, L.; FENG, G.; HILTON, A.; KURTOVIC, L.; OYONG, D.; PIERA, K. A.; BARBER, B. E.; WILLIAM, T.; EISEN, D. P.; MINIGO, G.; LANGER, C.; DREW, D. R.; RIVERA, F. L.; AMANTE, F. H.; WILLIAMS, T. N.; KINYANJUI, S.; MARSH, K.; DOOLAN, D. L.; ENGWERDA, C.; FOWKES, F. J. I.; GRIGG, M. J.; MUELLER, I.; MCCARTHY, J. S.; ANSTEY, N. M.; BEESON, J. G. IgM in human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. **Science Advances**, v. 5, n. 9, 2019.

BAPTISTA, B. O.; DE SOUZA, A. B. L.; DE OLIVEIRA, L. S.; DE SOUZA, H. A. S.; DE BARROS, J. P.; DE QUEIROZ, L. T.; DE SOUZA, R. S.; AMOAH, L. E.; SINGH, S. K.; THEISEN, M.; RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; RICCIO, E. K. P.; TOTINO, P. R. R.; LIMA-JUNIOR, J. C.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; PRATT-RICCIO, L. R. B-Cell Epitope Mapping of the *Plasmodium falciparum* Malaria Vaccine Candidate GMZ2.6c in a Naturally Exposed Population of the Brazilian Amazon. **Vaccines**, v. 11, n. 2, 2023.

BRASIL. **Guia de vigilância em saúde: volume único**. Ministério da Saúde, 3ª edição, 2019, 741 p.

BRASIL, L. M. B. F.; VIEIRA, J. L. F.; ARAÚJO, E. C.; PIANI, P. P. F.; DIAS, R. M.; VENTURA, A. M. R. S.; CABRAL, B. C.; BRÍGIDA, R. C. R. S.; DE ANDRADE, M. A. Cognitive performance of children living in endemic areas for *Plasmodium vivax*. **Malaria Journal**, v. 16, n. 370, 2017a.

BRASIL, P.; ZALIS, M. G.; DE PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A. M.; BIANCO JÚNIOR, C.; SILVA, S.; AREAS, A. L. L.; PELAJO-MACHADO, M.; DE ALVARENGA, D. A. M.; SANTELLI, A. C. F. S.; ALBUQUERQUE, H. G.; CRAVO, P.; DE ABREU, F. V. S.; PETERKA, C. L.; ZANINI, G. M.; MUTIS, M. C. S.; PISSINATTI, A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DE BRITO, C. F. A.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; CULLETON, R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. 1038-1046, 2017b.

BRAY, R. S.; GARNHAM, P. C. C. The life-cycle of primate malaria parasites. **British Medical Bulletin**, v.38, n. 2, p. 117-122, 1982.

BRIA, Y. P.; YEH, C-H.; BEDINGFIELD, S. Significant symptoms and nonsymptom-related factors for malaria diagnosis in endemic regions of Indonesia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 103, p. 194-200, 2021.

BURNS, A. L.; DANS, M. G.; BALBIN, J. M.; DE KONING-WARD, T. F.; GILSON, P. R.; BEESON, J. G.; BOYLE, M. J.; WILSON, D. W. Targeting malaria parasite invasion of red blood cells as an antimalarial strategy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 3, p. 223-238, 2019.

BUSHMAN, M.; ANTIA, R.; UDHAYAKUMAR, V.; DE ROODE, J. C. Within-host competition can delay evolution of drug resistance in malaria. **PLoS Biology**, v. 16, n. 8, 2018.

BUYON, L. E.; ELSWORTH, B.; DURAISINGH, M. T. The molecular basis of antimalarial drug resistance in *Plasmodium vivax*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 16, p. 23-37, 2021.

CARTER, R.; MENDIS, K. N. Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 564-594, 2002.

CHAPLIN, D. D. Overview of the Immune Response. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, 2010.

CHEN, Q.; SCHLICHOTHERLE, M.; WAHLGREN, M. Molecular Aspects of Severe Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 3, 2000.

COCKBURN, I. A.; AMINO, R.; KELEMEN, R. K.; KUO, S. C.; TSE, S-W.; RADTKE, A.; MAC-DANIEL, L. GANUSOV, V. V.; ZAVALA, F.; MÉNARD, R. *In vivo* imaging of CD8+T cell-mediated elimination of malaria liver stages. **PNAS**, v. 110, n. 22, p. 9090-9095, 2013.

COELHO, C. H.; DORITCHAMOU, J. Y.; A.; ZAIDI, I.; DUFFY, P. E. Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium. **Npj Vaccines**, v. 34, 2017.

COHEN, S.; MCGREGOR, I. A.; CARRINGTON, S. Gamma-Globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**, v. 192, n. 4804, p. 733-737, 1961.

COOK, J.; XU, W.; MSELLEM, M.; VONK, M.; BERGSTRÖM, B.; GOSLING, R.; AL-MAFAZY, A-W.; MCELROY, P.; MOLteni, F.; ABASS, A. K.; GARIMO, I.; RAMSAN, M.; ALI, A.; MARTENSSON, A.; BJÖRKMAN, A. Mass screening and treatment on the basis of results of a *Plasmodium falciparum*-specific rapid diagnostic test did not reduce malaria incidence in Zanzibar. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 9, p. 1476-1483, 2015.

COPPI, A.; PINZON-ORTIZ, C.; HUTTER, C.; SINNIS P. The *Plasmodium* circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 1, p. 27-33, 2005.

CORONADO, L. M.; NADOVICH, C. T.; SPADAFORA, C. Malarial hemozoin: from target to tool. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1840, n. 6, p. 2032-2041, 2014.

COX, F. E. G. History of human parasitology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 595-612, 2002.

COX, F. E. G. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 5, 2010.

CZAJKOWSKY, D. M.; SALANTI, A.; DITLEV, S. B.; SHAO, Z.; GHUMRA, A.; ROWE, J. A.; PLEASS, R. J. IgM, Fc μ Rs, and malarial immune evasion. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 9, p. 4597-4603, 2010.

DATASUS. **Indicadores e dados básicos – Brasil – 2000**. Disponível em: <

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idx2000/matriz.htm>>. Acesso em: Março de 2024.

DE NIZ, M.; BURDA, P-C.; KAISER, G.; DEL PORTILLO, H. A.; SPIELMANN, T.; FRISCHKNECHT, F.; HEUSSLER, V. T. Progress in imaging methods: insights gained into *Plasmodium* biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 37-54, 2017.

DEANE, L. M. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 5-14, 1986.

DODOO, D.; HOLLINGDALE, M. R.; ANUM, D.; KORAM, K. A.; GYAN, B.; AKANMORI, B. D.; OCRAN, J.; ADU-AMANKWAH, S.; GENESHAN, H.; ABOT, E.; LEGANO, J.; BANANIA, G.; SAYO, R.; BRAMBILLA, D.; KUMAR, S.; DOOLAN, D. L.; ROGERS, W. O.; EPSTEIN, J.; RICHIE, T. L.; SEDEGAH, M. Measuring naturally acquired immune responses to candidate malaria vaccine antigens in Ghanaian adults. **Malaria Journal**, v. 10, n. 168, 2011.

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

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired immunity to malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 1, 2009.

DREYER, A. M.; MATILE, H.; PAPASTOGIANNIDIS, P.; KAMBER, J.; FAVUZZA, P.; VOSS, T. S.; WITTLIN, S.; PLUSCHKE, G. Passive immunoprotection of *Plasmodium falciparum*-infected mice designates the CyRPA as candidate malaria vaccine antigen. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 12, p. 6225-6237, 2012.

EL-MOAMLY, A. A.; EL-SWEIFY, M. A. Malaria vaccines: the 60-year journey of hope and final success—lessons learned and future prospects. **Tropical Medicine and Health**, v. 51, n. 23, 2023.

EKSI, S.; WILLIAMSON, K. C. Protein targeting to the parasitophorous vacuole membrane of *Plasmodium falciparum*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 6, 2011.

FALL, A. K. D. J.; DECHAVANNE, C.; SABBAGH, A.; GARCIA, A.; COURTIN, D.; MIGOT-NABIAS, F. Combined polymorphisms involving the IgG heavy chain and Fc gamma receptors among Fulani and non-Fulani in Benin: implications for the natural protection of young Fulani against *Plasmodium falciparum* malaria infections. **Evolution**, v. 112, n. 105461, 2023.

FERREIRA-DA-CRUZ, M. F.; DESLANDES, D. C.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; MONTENEGRO-JAMES, S.; TARTAR, A.; DRUILHE, P.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Antibody responses to *Plasmodium falciparum* sporozoite-, liver- and blood-stage synthetic peptides in migrant and autochthonous populations in malaria endemic areas. **Parasite**, v. 2, n. 1, p. 23-29, 1995.

FRANÇA, C. T.; WHITE, M. T.; HE, W.-Q.; HOSTETLER, J. B.; BREWSTER, J.; FRATO, G.; MALHOTRA, I.; GRUSZCZYK, J.; HUON, C.; LIN, E.; KINIBORO, B.; YADAVA, A.; SIBA, P.; GALINSKI, M. R.; HEALER, J.; CHITNIS, C.; COWMAN, A. F.; TAKASHIMA, E.; TSUBOI, T.; THAM, W.-H.; FAIRHURST, R. M.; RAYNER, J. C.; KING, C. L.; MUELLER, I. Identification of highly-protective combinations of *Plasmodium vivax* recombinant proteins for vaccine development. **eLife**, v. 6, 2017.

GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax*: who cares?. **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, 2008.

GANTT, S.; PERSSON, C.; ROSE, K.; BIRKETT, A. J.; ABAGYAN, R.; NUSSENZWEIG, V. Antibodies against Thrombospondin-Related Anonymous Protein do not inhibit *Plasmodium* sporozoite infectivity in vivo. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3667-3673, 2000.

GERALD, N.; MAHAJAN, B.; KUMAR, S. Mitosis in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 4, 2011.

GONZÁLEZ-CERÓN, L.; CÉBRIAN-CARMONA, J.; MESA-VALLE, C. M.; GARCÍA-MAROTO, F.; SANTILLÁN-VALENZUELA, F.; GARRIDO-CARDENAS, J. A. *Plasmodium vivax* Cysteine-Rich Protective Antigen Polymorphism at Exon-1 Shows Recombination and Signatures of Balancing Selection. **Genes**, v. 12, n. 1, 2020.

GOSWAMI, D.; BETZ, W.; LOCHAM, N. K.; PARTHIBAN, C.; BRAGER, C.; SCHÄFER, C.; CAMARGO, N.; NGUYEN, T.; KENNEDY, S. Y.; MURPHY, S. C.; VAUGHAN, A. M.; KAPPE, S. H. A replication-competent late liver stage attenuated human malaria parasite. **JCI Insight**, v. 5, n. 13, 2020.

GOWDA, D. C.; WU, X. Parasite recognition and signaling mechanisms in innate immune responses to malaria. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 3006, 2018.

GREENWOOD, B.; MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, v. 415, p. 670-672, 2002.

GRIFFING, S. M.; TAUILL, P. L.; UDHAYAKUMAR, V.; SILVA-FLANNERY, L. A historical perspective on malaria control in Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 701-718, 2015.

GUTTERY, D. S.; PANDEY, R.; FERGUSON, D. J. P.; WALL, R. J.; BRADY, D.; GUPTA, D.; HOLDER, A. A.; TEWARI, R. *Plasmodium* DEH is ER-localized and crucial for oocyst mitotic division during malaria transmission. **Life Science Alliance**, v. 3, n. 12, 2020.

GUTTE, B. Peptides: synthesis, structure, and applications, **Academic Press**, 1ª edição, 1995, 511 p.

GUTZEIT, C.; CHEN, K.; CERUTTI, A. The enigmatic function of IgD: some answers at last. **European Journal of Immunology**, v. 48, n. 7, p. 1087-1258, 2018.

HABIBI, P.; SHI, Y.; GROSSI-DE-SA, M. F.; KHAN, I. Plants as sources of natural and recombinant antimalaria agentes. **Molecular Biotechnology**, v. 64, p. 1177-1197, 2022.

HART, K. J.; POWER, B. J.; RIOS, K. T.; SEBASTIAN, A.; LINDNER, S. E. The *Plasmodium* NOT1-G paralogue is an essential regulator of sexual stage maturation and parasite transmission. **PLoS Biology**, v. 19, n. 10, 2021.

HART, M. N.; MOHRING, F.; DONVITO, S. M.; THOMAS, J. A.; MULLER-SIENERTH, N.; WRIGHT, G. J.; KNUEPFER, E.; SAIBIL, H. R.; MOON, R. W. Sequential roles for red blood cell binding proteins enable phased commitment to invasion for malaria parasites. **Nature Communications**, v. 14, n. 4619, 2023.

HE, Q.; PASCUAL, M. An antigenic diversification threshold for falciparum malaria transmission at high endemicity. **PLoS Computational Biology**, v. 17, n. 2, 2021.

HE, W. Q.; SHAKRI, A. R.; BHARDWAJ, R.; FRANÇA, C. T.; STANISIC, D. I.; HEALER, J.; KINIBORO, B.; ROBINSON, L. J.; GUILLOTTE-BLISNICK, M.; HUON, C.; SIBA, P.; COWMAN, A.; KING, C. L.; THAM, W. H.; CHITNIS, C. E.; MUELLER, I. Antibody responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding and Erythrocyte binding proteins predict risk of infection and are associated with protection from clinical malaria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, 2019.

HILL, A. V. S. Vaccines against malaria. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 366, p. 2806-2814, 2011.

HOCHMAN, G. O sal como solução? Políticas de saúde e endemias rurais no Brasil (1940-1960). **Sociologias**, v. 12, n. 24, p. 158-193, 2010.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; OTTESEN, E.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 5, 2006.

IYER, J.; GRÜNER, A. C.; RÉNIA, L.; SNOUNOU, G.; PREISER, P. R. Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 231-249, 2007.

JIMAH, J. R.; SALINAS, N. D.; SALA-RABANAL, M.; JONES, N. G.; SIBLEY, L. D.; NICHOLS, C. G.; SCHLESINGER, P. H.; TOLIA, N. H. Malaria parasite CelTOS targets the inner leaflet of cell membranes for pore-dependent disruption. **eLIFE**, v. 5, 2016.

DE JONG, R. M.; TEBEJE, S. K.; MEERSTEIN-KESSEL, L.; TADESSE, F. G.; JORE, M. M.; STONE, W.; BOUSEMA, T. Immunity against sexual stage *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites. **Immunological Reviews**, v. 293, n. 1, p. 190-215, 2019.

JOOS, C.; MARRAMA, L.; POLSON, H. E. J.; CORRE, S.; DIATTA, A.-M.; DIOUF, B.; TRAPE, J.-F.; TALL, A.; LONGACRE, S.; PERRAUT, R. Clinical Protection from Falciparum Malaria Correlates with Neutrophil Respiratory Bursts Induced by Merozoites Opsonized with Human Serum Antibodies. **PLoS One**, v. 5, n. 3, 2010.

KAPPE, S.; BRUDERER, T.; GANTT, S.; FUJIOKA, H.; NUSSENZWEIG, V.; MÉNARD, R. Conservation of a Gliding Motility and Cell Invasion Machinery in Apicomplexan Parasites. **The Journal of Cell Biology**, v. 147, n. 5, p. 937-943, 1999.

KARIU, T.; ISHINO, T.; YANO, K.; CHINZEI, Y.; YUDA, M. CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1369-1379, 2006.

KEYT, B. A.; BALIGA, R.; SINCLAIR, A. M.; CARROLL, S. F.; PETERSON, M. S. Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies. **Antibodies**, v. 9, n. 4, 2020.

KLUG, D.; FRISCHKNECHT, F. Motility precedes egress of malaria parasites from oocysts. **Elife**, v. 6, 2017.

KNUEPFER, E.; WRIGHT, K. E.; PRAJAPATI, S. K.; RAWLINSON, T. A.; MOHRING, F.; KOCH, M. LYTH, O. R.; HOWELL, S. A.; VILLASIS, E.; SNIJDERS, A. P.; MOON, R. W.; DRAPER, S. J.; ROSANAS-URGEL, A.; HIGGINS, M. K.; BAUM, J.; HOLDER, A. A. Divergent roles for the RH5 complex components, CyRPA and RIPR in human infective malaria parasites. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 6, 2019.

KOCH, M.; BAUM, J. The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte—towards a reassessment of the host cell contribution. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 319-329, 2016.

KOCHAR, D. K.; SAXENA, V.; SINGH, N.; KOCHAR, S. K.; KUMAR, S. V.; DAS, A. *Plasmodium vivax* malaria. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 132-134, 2005.

KOEPFLI, C.; COLBORN, K. L.; KINIBORO, B.; LIN, E.; SPEED, T. P.; SIBA, P. M.; FELGER, I.; MUELLER, I. A High Force of *Plasmodium vivax* Blood-Stage Infection Drives the Rapid Acquisition of Immunity in Papua New Guinean Children. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, 2013.

KOSUWIN, R.; PUTAPORNTIP, C.; TACHIBANA, H.; JONGWUTIWES, S. Spatial Variation in Genetic Diversity and Natural Selection on the Thrombospondin-Related Adhesive Protein Locus of *Plasmodium vivax* (PvTRAP). **PLoS One**, v. 9, n. 10, 2014.

KRETTLI, A. U.; MILLER, L. H. Malaria: A sporozoite runs through it. **Current Biology**, v. 11, n. 10, 2001.

KURTOVIC, L.; BOYLE, M. J.; OPI, D. H.; KENNEDY, A. T.; THAM, W-H.; REILING, L.; CHAN, J-A.; BEESON, J. G. Complement in malaria immunity and vaccines. **Immunological Reviews**, v. 293, n. 1, p. 38-56, 2020.

KWIATKOWSKI, D.; CANNON, J. G.; MANOGUE, K. R.; CERAMI, A.; DINARELLO, C. A.; GREENWOOD, B. M. Tumour necrosis factor production in *Falciparum* malaria and its association with schizont rupture. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 77, n. 3, p. 361-366, 1989.

LAMARQUE, M.; BESTEIRO, S.; PAPOIN, J.; ROQUES, M.; NORMAND, B. V-L.; MORLON-GUYOT, J.; DUBREMETZ, F.; FAUQUENOY, S.; TOMAVO, S.; FABER, B. W.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BOULANGER, M. J.; BENTLEY, G. A.; LEBRUN, M. The RON2-AMA1 Interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 2, 2011.

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

LAURENS, M. B. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 16, n. 3, p. 480-489, 2020.

LEE, A. H.; SYMINGTON, L. S.; FIDOCK, D. A. DNA Repair Mechanisms and Their Biological Roles in the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 469-486, 2014.

LEE, K-S.; DIVIS, P. C. S.; ZAKARIA, S. K.; MATUSOP, A.; JULIN, R. A.; CONWAY, D. J.; COX-SINGH, J.; SINGH, B. *Plasmodium knowlesi*: reservoir hosts and tracking the emergence in humans and macaques. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 4, 2011.

LEETE, T. H.; RUBIN, H. Malaria and the cell cycle. **Parasitology Today**, v. 12, n. 11, p. 442-444, 1996.

LESTARI, C. S. W.; NOVIENTRI, G. Advantages of yeast-based recombinant protein technology as vaccine products against infectious diseases. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 913, 2021.

LIMA-JUNIOR, J. C.; RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; BANIC, D. M.; TRAN, T. M.; RIBEIRO, R. Y.; MEYER, V. S. E.; DE-SIMONE, S. G.; SANTOS, F.; MORENO, A.; BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. B cell epitope mapping and characterization of naturally acquired antibodies to the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-3 α (PvMSP-3 α) in malaria exposed individuals from Brazilian Amazon. **Vaccine**, v. 29, n. 9, p. 1801-1811, 2011.

LINDNER, S. E.; MILLER, J. L.; KAPPE, S. H. I. Malaria parasite pre-erythrocytic infection: preparation meets opportunity. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 316-324, 2012.

LIU, W.; LI, Y.; SHAW, K. S.; LEARN, G. H.; PLENDERLEITH, L. J.; MALENKE, J. A.; SUNDARARAMAN, S. A.; RAMIREZ, M. A.; CRYSTAL, P. A.; SMITH, A. G.; BIBOLLET-RUCHE, F.; AYOUBA, A.; LOCATELLI, S.; ESTEBAN, A.; MOUACHA, F.; GUICHET, E.; BUTEL, C.; AHUKA-MUNDEKE, S.; INOGWABINI, B-I.; NDJANGO, J-B. N.; SPEEDE, S.; SANZ, C. M.; MORGAN, D. B.; GONDER, M. K.; KRANZUSCH, P. J.; WALSH, P. D.; GEORGIEV, A. V.; MULLER, M. N.; PIEL, A. K.; STEWART, F. A.; WILSON, M. L.; PUSEY, A. E.; CUI, L.; WANG, Z.; FÄRNET, A.; SUTHERLAND, C. J.; NOLDER, D.; HART, J. A.; HART, T. B.; BERTOLANI, P.; GILLIS, A.; LEBRETON, M.; TAFON, B.; KIYANG, J.; DJOKO, C. F.; SCHNEIDER, B. S.; WOLFE, N. D.; MPOUDI-NGOLE, E.; DELAPORTE, E.; CARTER, R.; CULLETON, R. L.; SHAW, G. M.; RAYNER, J. C.; PEETERS, M.; HAHN, B. H.; SHARP, P. M. African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nature Communications**, v. 5, n. 3346, 2014.

LONGLEY, R. J.; REYES-SANDOVAL, A.; MONTOYA-DIAZ, E.; DUNACHIE, S.; KUMPITAK, C.; NGUITRAGOOL, W.; MUELLER, I.; SATTABONGKOT, J. Acquisition and longevity of antibodies to *Plasmodium vivax* preerythrocytic antigens in western Thailand. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, n. 2, 2016.

LOUNIBOS, L. P.; CONN, J. E. Malaria vector heterogeneity in South America. **American Entomologist**, v. 46, n. 4, 2000.

LOZANO, J. M.; PARRA, Z. R.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, S.; YASNOT-ACOSTA, M. F.; ROJAS, A. P.; MARÍN-WALDO, L. S.; RINCÓN, J. E. The search of a malaria vaccine: the time for modified immuno-potentiating probes. **Vaccines**, v. 9, n. 2, 2021.

MACMILLEN, Z.; HATZAKIS, K.; SIMPSON, A.; SHEARS, M. J.; WATSON, F.; ERASMUS, J. H.; KHANDHAR, A. P.; WILDER, B.; MURPHY, S. C.; REED, S. G.; DAVIE, J. W.; AVRIL, M. Accelerated prime-and-trap vaccine regimen in mice using repRNA-based CSP malaria vaccine. **npj Vaccines**, v. 9, n. 12, 2024.

MANDALA, W. L.; HARAWA, V.; DZINJALAMALA, F.; TEMBO, D. The role of different components of the immune system against *Plasmodium falciparum* malaria: Possible contribution towards malaria vaccine development. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 246, 2021.

MARQUES, M. M.; COSTA, M. R. F.; SANTANA FILHO, F. S.; VIEIRA, J. L. F.; NASCIMENTO, M. T. S.; BRASIL, L. W.; NOGUEIRA, F.; SILVEIRA, H.; REYES-LECCA, R. C.; MONTEIRO, W. M.; LACERDA, M. V. G.; ALECRIM, M. G. C. *Plasmodium vivax* chloroquine resistance and anemia in the western brazilian Amazon. **Antimicrobial Agents na Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 342-347, 2014.

MATOS, A. S.; RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; SOARES, I. F.; BAPTISTA, B. O.; SOUZA, R. M.; BITENCOURT-CHAVES, L.; TOTINO, P. R. R.; SÁNCHEZ-ARCILA, J. C.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; LÓPEZ-CAMACHO, C.; REYES-SANDOVAL, A.; PRATT-RICCIO, L. R.; LIMA-JUNIOR, J. C. Antibody responses against *Plasmodium vivax* TRAP recombinant and synthetic antigens in naturally exposed individuals from the brazilian Amazon. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 2230, 2019.

MATUSCHEWSKI, K.; NUNES, A. C.; NUSSENZWEIG, V.; MÉNARD, R. *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 7, p. 1597-1606, 2002.

MESÉN-RAMÍREZ, P.; BERGMANN, B.; TRAN, T. T.; GARTEN, M.; STÄCKER, J.; NARANJO-PRADO, I.; HÖHN, K.; ZIMMERBERG, J.; SPIELMANN, T. EXP1 is critical for nutrient uptake across the parasitophorous vacuole membrane of malaria parasites. **PLoS Biology**, v. 17, n. 9, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico - Dia da Malária nas Américas- um panorama da malária no Brasil em 2022 e no primeiro semestre de 2023**: Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, Vol. 55, 2024, 15p. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/situacao-epidemiologica-da-malaria/boletins-epidemiologicos-de-malaria>>. Acesso em: Janeiro de 2024.

MISCHLINGER, J.; RÖNNBERG, C.; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, M. J.; BÜHLER, S.; PAUL, M.; SCHLAGENHAUF, P.; PETERSEN, E.; RAMHARTER, M. Imported malaria in countries where malaria is not endemic: a comparison of semi-immune and nonimmune travelers. **Clinical Microbiology Reviews**, v.33, n. 2, 2020.

MÜLLER, H. M.; RECKMANN, I.; HOLLINGDALE, M. R. BIJARD, H.; ROBSON, K. J.; CRISANTI, A. Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. **The Embo Journal**, v. 12, n. 7, p. 2881-2889, 1993.

MWAISWELO, R. O.; MAWALA, W.; IVERSEN, P. O.; DE MONTALEMBERT, M.; LUZZATTO, L.; MAKANI, J. Sick cell disease and malaria: decreased exposure and asplenia can modulate the risk from *Plasmodium falciparum*. **Malaria Journal**, v. 19, n. 165, 2020.

MUNJAL, A.; KANNAN, D.; SINGH, S. A C2 domain containing plasma membrane protein of *Plasmodium falciparum* merozoites mediates calcium-dependent binding and invasion to host erythrocytes. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 56, n. 1, p. 139-149, 2023.

NAHA, K.; DASARI, S.; PRABHU, M. Spectrum of complications associated with *Plasmodium vivax* infection in a tertiary hospital in South-Western India. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 1, p. 79-82, 2012.

NAHRENDORF, W.; SCHOLZEN, A.; SAUERWEIN, R. W.; LANGHORNE, J. Cross-stage immunity for malaria vaccine development. **Vaccine**, v. 33, n. 52, p. 7513-7517, 2015.

NAJERA-MORRONGO, J. A. Malaria control: history shows it's possible. **World Health**, 1991.

NAZERI, S.; ZAKERI, S.; MEHRIZI, A. A.; DJADID, N. D. Naturally acquired immune responses to thrombospondin-related adhesion protein (TRAP) of *Plasmodium vivax* in patients from areas of unstable malaria transmission. **Acta Tropica**, v. 173, p. 45-54, 2017.

NAZERI, S.; MEHRIZI, A. A.; DJADID, N. D.; ZAKERI, S. A comparative study on worldwide genetic diversity and population structure analysis of *Plasmodium vivax* thrombospondin-related adhesive protein (PvTRAP) and its implications for the vivax vaccine design. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 36, p. 410-423, 2015.

DE OCA, M. M.; GOOD, M. F.; MCCARTHY, J. S.; ENGWERDA, C. R. The impact of established immunoregulatory networks on vaccine efficacy and the development of immunity to malaria. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 12, p. 4518-4526, 2016.

ODERO, J. O.; NAMBUNGA, I. H.; WANGRAWA, D. W.; BADOLO, A.; WEETMAN, D.; KOEKEMOER, L. L.; FERGUSON, H. M.; OKUMU, F. O.; BALDINI, F. Advances in the genetic characterization of the malaria vector, *Anopheles funestus*, and implications for improved surveillance and control. **Malaria Journal**, v. 22, n. 230, 2023.

ORISH, V. N.; BOAKYE-YIADOM, E.; ANSAH, E. K.; ALHASSAN, R. K.; DUEDU, A.; AWUKUS, Y. A.; OWUSU-AGYEI, S.; GYAPONG, J. O. Is malaria immunity a possible protection against severe symptoms and outcomes of COVID-19?. **Ghana Medical Journal**, v. 55, n. 2, p. 56-63, 2021.

PAIN, A.; FERGUSON, D. J.; KAI, O.; URBAN, B. C.; LOWE, B.; MARSH, K.; ROBERTS, D. J. Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 4, p. 1805-1810, 2001.

PAUL, A. S.; EGAN, E. S.; DURAISINGH, M. T. Host-parasite interactions that guide red blood cell invasion by malaria parasites. **Current Opinion in Hematology**, v. 22, n. 3, p. 220-226, 2015.

PEREIRA-SILVA, J. W.; MARTINS-CAMPOS, K. M.; FERREIRA-NETO, J. V.; LACERDA, M. V. G.; PESSOA, F. A. C.; RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M. Amazonian *Anopheles* with low numbers of oocysts transmit *Plasmodium vivax* sporozoites during a blood meal. **Scientific Reports**, v. 12, n. 19442, 2022.

PERKINS, D. J.; WERE, T.; DAVENPORT, G. C.; KEMPAIAH, P.; HITTNER, J. B.; ONG'ECHA, J. M. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1427-1442, 2011.

PIRAHMADI, S.; ZAKERI, S.; MEHRIZI, A. A.; DJADID, N. D.; RAZ, A-A.; SANI, J. J.; ABBASI, R.; GHORBANZADEH, Z. Cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites (CelTOS) formulated with potent TLR adjuvants induces high-affinity antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* infection in *Anopheles stephensi*. **Malaria Journal**, v. 18, n. 146, 2019.

POHL, K.; COCKBURN, I. A. Innate immunity to malaria: The good, the bad and the unknown. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.

POLLET, J.; CHEN, W-H.; STRYCH, U. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 170, p. 71-82, 2021.

PRADEL, G.; GARAPATY, S.; FREVERT, U. Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 637-351, 2002.

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

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 849-856, 2006.

RATHORE, D.; SACCI, J. B.; DE LA VEGA, P.; MCCUTCHAN, T. F. Binding and invasion of liver cells by *Plasmodium falciparum* sporozoites. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 9, p. 7092-7098, 2002.

REDDY, K. S.; AMLABU, E.; PANDEY, A. K.; MITRA, P.; CHAUHAN, V. S.; GAUR, D. Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion. **PNAS**, v. 112, n. 4, p. 1179-1184, 2015.

REYES-SANDOVAL, A.; SRIDHAR, S.; BERTHOUD, T.; MOORE, A. C.; HARTY, J. T.; GILBERT, S. C.; GAO, G.; ERTL, H. C. J.; WILSON, J. C.; HILL, A. V. S. Single-dose immunogenicity and protective efficacy of simian adenoviral vectors against *Plasmodium berghei*. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 3, p. 732-741, 2008.

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

ROBSON, K. J. H.; FREVERT, U.; RECKMANN, I.; COWAN, G.; BEIER, J.; SCRAGG, I. G.; TAKEHARA, K.; BISHOP, D. H. L.; PRADEL, G.; SINDEN, R.; SACCHIO, S.; MÜLLER, H.-M.; CRISANTI, A. Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum*: expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes. **The EMBO Journal**, v. 14, n. 16, p. 3883-3894, 1995.

RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; SOARES, I. F.; LOPEZ-CAMACHO, C.; DA SILVA, J. H. M.; PERCE-DA-SILVA, D. S.; TÊVA, A.; FRANCO, A. M. R.; PINHEIRO, F. G.; CHAVES, L. B.; PRATT-RICCIO, L. R.; REYES-SANDOVAL, A.; BANIC, D. M.; LIMA-JÚNIOR, J. C. *Plasmodium vivax* Cell-Traversal Protein for Ookinetes and Sporozoites: naturally acquired humoral immune response and B-Cell epitope mapping in Brazilian Amazon inhabitants. **Frontiers in Immunology**, v.8, n. 77, 2017.

ROGERS, W. O.; MALIK, A.; MELLOUK, S.; NAKAMURA, K.; ROGERS, M. D.; SZARFMAN, A.; GORDON, D. M. NUSSLER, A. K.; AIKAWA, M.; HOFFMAN, S. L. Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. **Proceedings of the National Academy of Science of America**, v. 89, n. 19, p. 9176-9180, 1992.

ROWE, A.; OBEIRO, J.; NEWBOLD, C. I.; MARSH, K. *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 3, p. 2323-2326, 1995.

ROWE, J. A.; SHAFI, J.; KAI, O. K.; MARSH, K.; RAZA, A. Nonimmune IgM but not IgG binds to the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and correlates with rosetting and severe malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 6, p. 692-699, 2002.

SAADI, M.; KARKHAH, A.; NOURI, H. R. Development of a multi-epitope peptide vaccine inducing robust T cell responses against brucellosis using immunoinformatics based approaches. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 51, p. 227-234, 2017.

SALLARES, R.; BOUWMAN, A.; ANDERUNG, C. The spread of malaria to southern Europe in antiquity: new approaches to old problems. **Medical History**, v. 48, p. 311-328, 2004.

DE SANTANA FILHO, F. S.; ARCANJO, A. R. L.; CHEHUAN, Y. M.; COSTA, M. R.; MARTINEZ-ESPINOSA, F. E.; VIEIRA, J. L.; BARBOSA, M. G. V.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G. C. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, 2007.

SATO, S. *Plasmodium*- a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 40, n. 1, 2021.

SCHUR, P. H. IgG subclasses. A historical perspective. **Monographs in Allergy**, v. 23, p. 1-11, 1988.

SHARP, P. M.; PLENDERLEITH, L. J.; HAHN, B. H. Ape origins of human malaria. **Annual Review of Microbiology**, v. 74, p. 39-63, 2020.

SICILIANO, G.; ALANO, P. Enlightening the malaria parasite life cycle: bioluminescent *Plasmodium* in fundamental and applied research. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 391, 2015.

SIDEN-KIAMOS, I.; SPANOS, L.; CURRÁ, C. A method for purification of *Plasmodium* oocysts from mosquito midguts. **Scientific Reports**, v. 10, n. 7262, 2020.

SILVA, S. R.; ALMEIDA, A. C. G.; DA SILVA, G. A. V.; RAMASAWMY, R.; LOPES, S. C. P.; SIQUEIRA, A. M.; COSTA, G. L.; SOUSA, T. N.; VIEIRA, J. L. F.; LACERDA, M. V. G.; MONTEIRO, W. M.; DE MELO, G. C. Chloroquine resistance is associated to multi-copy *pvcrt-o* gene in *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 17, n. 267, 2018.

SINGH, B.; DANESHVAR, C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, 2013.

SINNIS, P.; CLAVIJO, P.; FENYÖ, D.; CHAIT, B. T.; CERAMI, C.; NUSSENZWEIG, V. Structural and functional properties of region II-Plus of the malaria Circumsporozoite Protein. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 1, p. 297-306, 1994.

SINNIS, P.; SIM, K. L. Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 2, 1997.

SKWARCZYNSKI, M.; CHANDRUDU, S.; RIGAU-PLANELLA, B.; ISLAM, M. T.; CHEONG, Y. S.; LIU, G.; WANG, X.; TOTH, I.; HUSSEIN, W. M. Progress in the development of subunit vaccines against malaria. **Vaccines**, v. 8, n. 3, 2020.

SKWARCZYNSKI, M.; TOTH, I. Peptide-based synthetic vaccines. **Chemical Science**, v. 7, n. 2, p. 842-854, 2016.

SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 3, p. 317-332, 1998.

SOJKA, D.; JALOVECKÁ, M.; PERNER, J. *Babesia*, *Theileria*, *Plasmodium* and hemoglobin. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, 2022.

SONG, G.; KOKSAL, A. C.; LU, C.; SPRINGER, T. A. Shape change in the receptor for gliding motility in *Plasmodium* sporozoites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 52, p. 21420-21425, 2012.

SOULARD, V.; BOSSON-VANGAL, H.; LORTHIOIS, A.; ROUCHER, C.; FRANETICH, J-F.; ZANGHI, G.; BORDESSOULLES, M.; TEFIT, M.; THELLIER, M.; MOROSAN, S.; NAOUR, G. L.; CAPRON, F.; SUEMIZU, H.; SNOUNOU, G.; MORENO-SABATER, A.; MAZIER, D. *Plasmodium falciparum* full life cycle and *Plasmodium ovale* liver stages in humanized mice. **Nature Communications**, v. 6, n. 7690, 2015.

SPILLMAN, N. J.; BECK, J. R.; GOLDBERG, D. E. Protein export into malaria parasite-infected erythrocytes: mechanisms and functional consequences. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, p. 813-841, 2015.

SPRINGER, T. A. Complement and the multifaceted functions of VWA and integrin I domains. **Structure**, v. 14, n. 11, p. 1611-1616, 2006.

STANWAY, R. R.; WITT, T.; ZOBIAK, B.; AEPFELBACHER, M.; HEUSSLER, V. T. GFP-targeting allows visualization of the apicoplast throughout the life cycle of live malaria parasites. **Biology of the Cell**, v. 101, n. 7, p. 415-435, 2009.

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

SULTAN, A. A.; THATHY, V. FREVERT, U.; ROBSON, K. J. H.; CRISANTI, A.; NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S.; MENÉRD, R. TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. **Cell**, v. 90, n. 3, p. 511-522, 1997.

SUN, P.; SCHWENK, R.; WHITE, K.; STOUTE, J. A.; COHEN, J.; BALLOU, W. R.; VOSS, G.; KESTER, K. E.; HEPNER, D. G.; KRZYCH, U. Protective immunity induced with malaria vaccine, RTS,S, is linked to *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein-specific CD4 and CD8 T cells producing IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 12, p. 6961-6967, 2003.

TA, T. H.; HISAM, S.; LANZA, M.; JIRAM, A. I.; ISMAIL, N. P.; RUBIO, J. M. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malaria Journal**, v. 13, n. 68, 2014.

TACHIBANA, M.; TAKASHIMA, E.; MORITAB, M.; SATTABONGKOTC, J.; ISHINO, T.; CULLETON, R.; TORII, M.; TSUBOI, T. *Plasmodium vivax* transmission-blocking vaccines: progress, challenges and innovation. **Parasitology International**, v. 87, 2022.

TAKASHIMA, E.; TACHIBANA, M.; MORITA, M.; NAGAOKA, H.; KANOI, B. N.; TSUBOI, T. Identification of novel malaria transmission-blocking vaccine candidates. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. 805482, 2021.

TAMBORRINI, M.; HAUSER, J.; SCHÄFER, A.; AMACKER, M.; FAVUZZA, P.; KYUNGTA, K.; FLEURY, S.; PLUSCHKE, G. Vaccination with virosomally formulated recombinant CyRPA elicits protective antibodies against *Plasmodium falciparum* parasites in preclinical in vitro and in vivo models. **NPJ Vaccines**, v. 5, n. 9, 2020.

TAN, M. S. Y.; BLACKMAN, M. J. Malaria parasite egress at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 134, n. 5, 2021.

TASHI, T.; UPADHYEL, A.; KUNDU, P.; WU, C.; MENANT, S.; SOARES, R. R.; FERREIRA, M. U.; LONGLEY, R. J.; MUELLER, I.; HOANG, Q. Q.; THAM, W-H.; RAYNER, J. C.; SCOPEL, K. K. G.; LIMA-JUNIOR, J. C.; TRAN, T. M. Longitudinal IgG antibody responses to *Plasmodium vivax* blood-stage antigens during and after acute vivax malaria in individuals living in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 11, 2022.

TEMPLETON, T. J.; KASLOW, D. C. Cloning and cross-species comparison of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene from *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium gallinaceum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 84, n. 1, p. 13-24, 1997.

TEO, A.; FENG, G.; BROWN, G. V.; BEESON, J. G.; ROGERSON, S. J. Functional antibodies and protection against blood-stage Malaria. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 11, p. 887-898, 2016.

TEWARI, R.; SPACCAPELO, R.; BISTONI, F.; HOLDER, A. A.; CRISANTI, A. Function of region I and II adhesive motifs of *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Protein in sporozoite motility and infectivity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 47613-47618, 2002.

THAM, W-H.; BEESON, J. G.; RAYNER, J. C. *Plasmodium vivax* vaccine research—we've only just begun. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 2-3, p. 111-118, 2017.

TUTEJA, R. Malaria - an overview. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4669-4941, 2007.
VASQUEZ, M.; ZUNIGA, M.; RODRIGUEZ, A. Oxidative stress and pathogenesis in malaria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. 768182, 2021.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPEN, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector function. **Frontiers in Immunology**, v.5, n. 520, 2014.

VOLZ, J. C.; YAP, A.; SISQUELLA, X.; THOMPSON, J. K.; LIM, N. T. Y.; WHITEHEAD, L. W.; CHEN, L.; LAMPE, M.; THAM, W-H.; WILSON, D.; NEBL, T.; MARAPANA, D.; TRIGLIA, T.; WONG, W.; ROGERS, K. L.; COWMAN, A. F. Essential role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. **Cell Host & Microbe**, v. 20, p. 60-71, 2016.

WASSMER, S. C.; GRAU, G. E. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front?. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 2-3, p. 145-152, 2017.

WASSMER, S. C.; TAYLOR, T. E.; RATHOD, P. K.; MISHRA, S. K.; MOHANTY, S.; AREVALO-HERRERA, M.; DURAISINGH, M. T.; SMITH, J. D. Investigating the pathogenesis of severe malaria: a multidisciplinary and cross-geographical approach. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 3, p. 42-56, 2015.

WEBSTER, D. P.; DUNACHIE, S.; VUOLA, J. M.; BERTHOUD, T.; KEATING, S.; LAIDLAW, S. M.; MCCONKEY, S. J.; POULTON, I.; ANDREWS, L.; ANDERSEN, R. F.; BEJON, P.; BUTCHER, G.; SINDEN, R.; SKINNER, M. A.; GILBERT, S. C.; HILL, A. V. S. Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. **PNAS**, v. 102, n. 13, p. 4836-4841, 2005.

WHITE, N. J. Severe malaria. **Malaria Journal**, v. 21, n. 284, 2022.

WHO. **Health topics – Malaria**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/malaria#tab=tab_1>. Acesso em: Março de 2024c.

WHO. **Malaria vaccine: WHO position paper – March 2022**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9709-61%E2%80%939380>>. Acesso em: Abril de 2023b.

WHO. **Questions and Answers: Malaria vaccines (RTS,S and R21)**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/q-a-on-rt-s-malaria-vaccine>>. Acesso em: Fevereiro de 2024b.

WHO. **WHO Guidelines for malaria**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/guidelines-for-malaria>> Acesso em: Janeiro de 2024a.

WHO. **World Malaria Report 2023c**. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023>>. Acesso em: Janeiro de 2024.

WIPASA, J.; ELLIOTT, S.; XU, H.; GOOD, M. F. Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. **Immunology and Cell Biology**, v. 80, n. 5, p. 401-507, 2002.

WUNDERLICH, J.; ROHRBACH, P.; DALTON, J. P. The malaria digestive vacuole. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, n. 4, p. 1424-1448, 2012.

YEPES-PÉREZ, Y.; LÓPEZ, C.; SUÁREZ, C. F.; PATARROYO, M. A. *Plasmodium vivax* Pv12 B-cell epitopes and HLA-DR β 1-dependent T-cell epitopes in vitro antigenicity. **PLoS One**, v. 13, n. 9, 2018.

ZOLLNER, G. E.; PONSÁ, N.; GARMAN, G. W.; POUDEL, S.; BELL, J. A.; SATTABONGKOT, J.; COLEMAN, R. E.; VAUGHAN, J. A. Population dynamics of sporogony for *Plasmodium vivax* parasites from western Thailand developing within three species of colonized Anopheles mosquitoes. **Malaria Journal**, v. 5, n. 68, 2006.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 445-489, 2010.

ANEXO A – Artigo de coautoria já publicado

Available online at www.sciencedirect.com**ScienceDirect**

Journal of Nutritional Biochemistry 123 (2024) 109492

**Journal of
Nutritional
Biochemistry**

RESEARCH PAPER

DHA-rich fish oil plays a protective role against experimental cerebral malaria by controlling inflammatory and mechanical events from infection

Bárbara Albuquerque Carpinter^a, Daniela Chaves Renhe^a, Jéssica Correa Bezerra Bellei^a, Carolina David Vieira^a, Cinthia Magalhães Rodolphi^a, Marcos Vinicius Rangel-Ferreira^b, Camila Simões de Freitas^c, Adolfo Firmino da Silva Neto^d, Eduardo Antônio Ferraz Coelho^c, Bruno de Siqueira Mietto^d, Flávia Lima Ribeiro Gomes^b, Vinicius Novaes Rocha^e, Kézia Katiani Gorza Scopel^{a,*}

^a Department of Parasitology, Microbiology and Immunology and Post-Graduation Program in Biological Science, Research Centre of Parasitology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

^b Laboratory of Malaria Research, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

^c Post-graduation Program in Health Sciences, Infectology and Tropical Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^d Department of Biology, Research Centre of Cellular Biology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

^e Department of Veterinary Medicine, Research Centre of Pathology and Veterinary Histology, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

Received 4 February 2023; received in revised form 17 May 2023; accepted 17 October 2023

ANEXO B – Artigo de coautoria submetido 01

Microbes and Infection
**LUNG DAMAGE INDUCED BY EXPERIMENTAL MALARIAL INFECTION IS
 MITIGATED BY DIETARY SUPPLEMENTATION WITH DHA-RICH FISH OIL**
 --Manuscript Draft--

| | |
|------------------------------|---|
| Manuscript Number: | |
| Article Type: | Original article |
| Keywords: | malaria, lung injury, omega-3, DHA |
| Corresponding Author: | Kezia Katiani Gorza Scopel, Ph.D Federal University of Juiz de Fora Juiz de Fora, MG BRAZIL |
| First Author: | Carolina David-Vieira |
| Order of Authors: | Carolina David-Vieira |
| | Bárbara Albuquerque Carpinter |
| | Jéssica Correia Bezerra Bellei |
| | Letícia Ferreira Machado |
| | Felipe Oliveira Raimundo |
| | Cinthia Magalhães Rodolphi |
| | Daniela Chaves Renhe |
| | Isabella Rodrigues Nogueira Guedes |
| | Fernanda Mikaela Moreira Gonçalves |
| | Ludmila Ponce Monkén Custódio Pereira |
| | Marcos Vinicius Rangel Ferreira |
| | Haroldo Lobo dos Santos Nascimento |
| | Adolfo Firmino Neto |
| | Flávia Lima Oliveira Gomes |
| | Vinicius Novaes Rocha |
| | Juciane Maria de Andrade Castro |
| | Kezia Katiani Gorza Scopel, Ph.D |

ANEXO C – Artigo de coautoria submetido 02

**Immunogenicity of PvCyRPA, PvCelTOS and Pvs25 chimeric recombinant protein of *Plasmodium vivax* in murine model**

1 **Ada da Silva Matos¹; Isabela Ferreira Soares¹; Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva²; Cinthia**
2 **Magalhães Rodolphi⁴; Letusa Albrecht⁵; Rafael Amaral Donassolo⁵; Cesar Lopez-Camacho⁶;**
3 **Ana Paula Dinis Ano Bom⁷; Patrícia Cristina da Costa Neves⁷; Fernando de Paiva Conte⁸;**
4 **Lilian Rose Pratt Riccio³; Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro³; Paulo Renato Rivas Totino³; Josué**
5 **da Costa Lima-Junior^{1*}.**

6 ¹Immunoparasitology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute (IOC), Oswaldo Cruz Foundation
7 (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil

8 ²Hantaviruses and Rickettsioses Laboratory, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

9 ³Malaria Research Laboratory, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

10 ⁴Parasitology Research Center, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), MG, Brazil

11 ⁵Apicomplexa Research Laboratory, Carlos Chagas Institute, Curitiba, Brazil

12 ⁶Nuffield Department of Medicine, The Jenner Institute, University of Oxford, Oxford, United
13 Kingdom

14 ⁷Immunological Technology Laboratory, Immunobiological Technology Institute (Bio-
15 Manguinhos/Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil

16 ⁸Eukaryotic Pilot Laboratory, Immunobiological Technology Institute (Bio-Manguinhos/Fiocruz),
17 Rio de Janeiro, Brazil