

NATÁLIA SOARES FERREIRA

Análise das subpopulações de células T e B e mapeamento de epítomos de linfócitos T em amostras de indivíduos com malária vivax residentes em uma área endêmica brasileira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Urbano Ferreira

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2021

RESUMO

FERREIRA, N. S. **Análise das subpopulações de células T e B e mapeamento de epítomos de linfócitos T em amostras de indivíduos com malária vivax residentes em uma área endêmica brasileira.** 2021. 293 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Considerada um dos maiores problemas de saúde pública, a malária no Brasil causa alta morbidade, atingindo quase exclusivamente a população da região amazônica, sendo o *Plasmodium vivax* a espécie mais prevalente no país. As frequentes infecções induzem a geração de uma imunidade clínica que protege o indivíduo das complicações da doença, mas não da infecção. Células B e T exercem importante papel na resposta imune protetora e, diante disso, neste trabalho, algumas subpopulações destes dois grupos celulares foram analisadas em amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) obtidas de indivíduos com malária vivax na fase aguda e convalescente, de indivíduos controles expostos não infectados, moradores de uma área endêmica brasileira, e de indivíduos controles não expostos. Por citometria de fluxo multiparamétrica, a análise de PBMCs de 41 pacientes com malária, em comparação com 40 controles expostos não infectados, mostrou um aumento da frequência de células T reguladoras (Treg) que expressam CTLA-4 (uma molécula imunossupressora), com os níveis de expressão desta molécula sendo proporcionais à parasitemia. A frequência de células T foliculares reguladoras (Tfr) positivas para CTLA-4 também estava aumentada durante a malária. Estas células são um subgrupo das células Treg que atuam na regulação da resposta de células B e células T auxiliares foliculares (Tfh) nos centros germinativos. Células Tfh são especializadas em auxiliar as células B na produção de anticorpos com alta afinidade. Em nossas análises, foi observado que a infecção pelo *P. vivax* induziu um aumento da frequência destas células, com aquelas de perfil Th1 e Th2 estando em maiores proporções, quando comparadas aos controles expostos. Durante a malária aguda também encontramos maiores proporções de células B de memória atípica, que são mantidas mesmo após o tratamento da doença. O contrário foi observado para a população de células B reguladoras (Breg) com fenótipo CD24^{hi}CD27⁺, que apresentaram uma queda em suas frequências na fase aguda da infecção. Após estímulo em cultura com lipopolissacarídeo (LPS), *phorbol-12-myristate-13-acetate* (PMA) e ionomicina, uma maior frequência de diversas subpopulações de células B produtoras de interleucina-10 (IL-10) foi encontrada nas amostras dos pacientes na fase aguda da malária em comparação com a fase convalescente (38 amostras pareadas analisadas). A resposta imune específica das células T CD4⁺ também foi investigada utilizando 25 pares de amostras de pacientes com malária aguda e na fase convalescente, 25 controles expostos e 13 controles não expostos. Para isso, foi realizado o mapeamento de peptídeos presentes em três proteínas expressas pelos merozoítos do *P. vivax*: o ectodomínio do antígeno 1 de membrana apical (AMA1ect), o domínio II da proteína de ligação ao antígeno Duffy (DBPII) e a porção de 42 kDa da proteína 1 de superfície do merozoíto (MSP1-42). Utilizando ensaios de ELISpot, foram identificados dois peptídeos mais amplamente reconhecidos que induziram a produção de IL-10 em 20 e 16% das amostras de fase aguda da malária, com um deles estando presente na DBPII (RYNKDFCKDIRWSLGDFGDI) e o outro na MSP1-42 (KTHLTAVNEEVKKVEADIK), respectivamente. Como estes peptídeos não foram amplamente reconhecidos na fase convalescente, concluímos que a resposta celular específica encontrada na fase aguda não é mantida após o tratamento da infecção.

Palavras-chave: Malária. *Plasmodium vivax*. Células B. Células T. Mapeamento de epítomos.

ABSTRACT

FERREIRA, N. S. **T and B cell subpopulations analysis and T-cell epitope mapping in samples of individuals with vivax malaria residing in an endemic Brazilian area.** 2021. 293 p. Ph. D. Thesis (Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Considered one of the biggest public health problems, malaria in Brazil causes high morbidity, affecting almost exclusively the population of Amazon region, with *Plasmodium vivax* being the most prevalent species in the country. Frequent infections induce generation of clinical immunity, which protects the individual from disease complications, but not from the infection. B and T cells play an important role in protective immune response, and therefore, in this work, some subpopulations of these two cell groups were analyzed in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) samples obtained from individuals with vivax malaria in the acute and convalescent phase, uninfected exposed control individuals, living in an endemic Brazilian area, and non-exposed control individuals. By multiparametric flow cytometry, analysis of PBMCs from 41 malaria patients, compared to 40 exposed uninfected controls, showed an increase in regulatory T cells (Treg) frequency that express CTLA-4 (an immunosuppressive molecule), with expression levels of this molecule being proportional to parasitemia. The CTLA-4 positive follicular regulatory T cells (Tfr) frequency was also increased during malaria. These cells are a Treg cells subgroup that regulates B cells and follicular helper T cells (Tfh) response in the germinal centers. Tfh cells are specialized to help B cells in the production of high affinity antibodies. In our analyzes, it was observed that *P. vivax* infection induced an increase in the frequency of these cells, with those of Th1 and Th2 profiles in greater proportions, when compared to exposed controls. During acute malaria, we also found higher proportions of atypical memory B cells, which are maintained even after disease treatment. The opposite was observed for the regulatory B cells (Breg) population with the CD24^{hi}CD27⁺ phenotype, which showed a decrease in their frequencies in the acute phase of infection. After culture stimulation with lipopolysaccharide (LPS), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin, a higher frequency of several subpopulations of interleukin-10 (IL-10)-producing B cells was found in samples from patients with acute vivax malaria when compared to the convalescent phase (38 paired samples analyzed). The specific CD4⁺ T cells immune response was also investigated using 25 pairs of samples from patients with acute and convalescent malaria, 25 exposed controls, and 13 non-exposed controls. For this purpose, we carried out peptide mappings present in three proteins expressed by *P. vivax* merozoites: the apical membrane antigen 1 ectodomain (AMA1ect), Duffy binding protein domain II (DBPII) and the portion of 42 kDa of merozoite surface protein-1 (MSP1-42). Using ELISpot assays, two most widely recognized peptides that induced IL-10 production in 20 and 16% of vivax malaria acute phase samples were identified, with one present in DBPII (RYNKDFCKDIRWSLGDFGDI) and the other in MSP1-42 (KTHLTAVNEEVKKVEADIK), respectively. As these peptides were not widely recognized in the convalescent phase, we conclude that the specific cellular response found in acute phase is not maintained after treatment.

Keywords: Malaria. *Plasmodium vivax*. B cells. T cells. Epitope mapping.

1 INTRODUÇÃO

Quando falamos de problemas de saúde pública, a malária é ainda considerada um dos mais sérios a nível mundial, por ser uma das doenças com forte impacto na morbidade e mortalidade da população que vive em países tropicais e subtropicais (Ministério da Saúde (BR), 2020b). Como no Brasil a malária é uma doença muito comum na região amazônica, para o desenvolvimento da nossa pesquisa escolhemos estudar alguns parâmetros da resposta imune gerados pela infecção parasitária.

O levantamento bibliográfico foi realizado com o intuito de abordar os assuntos relacionados tanto à doença em questão, como aqueles envolvidos na investigação científica que foi conduzida. Assim, uma parte da revisão da literatura foi baseada nos conhecimentos sobre a malária, com a abordagem dos temas: história da doença; de que maneira está distribuída no Brasil e no mundo; seu impacto no genoma humano; a forma de transmissão e o ciclo de vida do parasito; seu diagnóstico, tratamento e prevenção; manifestações clínicas, possíveis complicações e suas principais causas.

Sabendo da importância da doença e seu comportamento, os temas abordados foram: a maneira que nosso organismo responde à infecção pelo parasito; quais são os “pontos fortes e fracos” do sistema imune durante a resposta gerada; quais células estão envolvidas e quais são as mais importantes para a resolução da infecção. Com essas informações, conduzimos o leitor a entender as razões pelas quais escolhemos estudar algumas populações celulares que podem ser afetadas de alguma maneira pela doença.

Por fim, foram abordadas as características das principais proteínas estudadas do parasito causador da malária, especialmente para o desenvolvimento de vacinas, pois foram elas as escolhidas para uma das investigações do nosso estudo. Diante disso, os últimos tópicos estão voltados para as pesquisas sobre mapeamento de epítomos presentes nestas proteínas, e como esta técnica pode auxiliar tanto na busca de vacinas quanto no entendimento da dinâmica da resposta imune celular específica, que foi um dos principais objetivos deste trabalho.

Os protocolos experimentais das técnicas escolhidas foram padronizados e descritos com detalhes, para que as possíveis consultas a eles sejam bem aproveitadas. Em seguida, nossos resultados foram apresentados, discutidos, e as principais conclusões foram apontadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História da malária

A malária é uma doença muito antiga que assombra a humanidade desde seu surgimento. Há pelo menos meio bilhão de anos, provavelmente, já existiam os ancestrais dos parasitos causadores da malária (Carter & Mendis, 2002). Com seu aparecimento nos tempos da Idade Antiga, também surgiram mitos como forma de justificar esta doença até então desconhecida. As pessoas acreditavam que a causa das manifestações da malária era oriunda de influências sobrenaturais (Neghina et al., 2010). Registros históricos da China de 2700 a.C., Mesopotâmia (2000 a.C.), Egito (1570 a.C.) e de origem Hindu (600 a.C.) mostram evidências da ocorrência de malária nestes tempos (Cox, 2010). Contudo, antígenos de parasitos causadores da malária foram encontrados em amostras de indivíduos egípcios que datam 3200 a.C., indicando que, naquele tempo, as pessoas já estavam sofrendo com a doença que foi responsável por muitas mortes devido à falta de tratamento (Miller et al., 1994).

Desde os relatos do Cânon Chinês da medicina, Nei Ching, até a descoberta de Ronald Ross, foram necessários mais de 4 milênios para que uma das doenças mais debilitantes da humanidade fosse finalmente desmistificada (Neghina et al., 2010). Em 2700 a.C., o médico chinês Nei Ching fazia associações da febre terçã (a cada três dias) e quartã (a cada quatro dias) com a esplenomegalia, além de atribuir a demônios estes episódios de febre, assim como as dores de cabeça e calafrios (Arrow et al., 2004). Em seguida foram surgindo relatos de diversas civilizações contendo valiosas informações, como as febres outonais conhecidas como “Rei das doenças” e o aumento do baço, que constam em documentos do Período Védico (1500 a 800 a.C.), sendo indícios de que a malária existia na Índia durante aquele tempo (Arrow et al., 2004; Neghina et al., 2010). Relatos também do chinês Zuo Qiuming (cerca de 500 a.C.) contam a respeito do episódio em que um ministro adquiriu a doença após a picada de um inseto, além de outros documentos que mencionam o aparecimento da malária durante o final do verão e início do outono, e que estava sendo causada pela picada de mosquitos (Neghina et al., 2010).

Apesar de todos os relatos documentados sobre os sinais e sintomas apresentados durante a malária, foi o médico grego Hipócrates (460-377 a.C.), considerado o pai da medicina, que descreveu claramente o paroxismo malárico

(calafrio, febre e sudorese) e os tipos da doença, fatal e não fatal, de acordo com a periodicidade febril, além de estimar a significância do diagnóstico de esplenomegalia (Cunha & Cunha, 2008).

Na Roma Antiga, a presença da doença febril durante o verão começou a ser correlacionada com a água estagnada nos pântanos (Cunha & Cunha, 2008; Neghina et al., 2010) e assim, o termo malária, do italiano “mal’aria” que tem como significado “maus ares”, surgiu devido a ideia de que a febre malárica era causada pelos miasmas que subiam dos pântanos (Cox, 2010; Cunha & Cunha, 2008), uma teoria que persistiu por mais de 2.500 anos (Cox, 2010).

2.1.1 A descoberta da causa da malária e sua transmissão

Em 20 de outubro de 1880, o parasito causador da malária é descrito por Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922), um médico do exército francês. De acordo com os estudos daquela época, Laveran sabia que muitas doenças atribuídas a miasmas eram na verdade causadas por micróbios, e resolveu investigar essa teoria quando foi transferido para um posto na costa norte-africana da Argélia (Arrow et al., 2004). Ao analisar uma amostra de sangue de um soldado com malária, visualizou corpos no formato de lua crescente que apresentavam um pigmento (atualmente conhecido como hemozoína), e que não eram observados em amostras de indivíduos saudáveis (Arrow et al., 2004; Cox, 2010; Laveran, 1982). Laveran descreveu as diferentes formas do parasito que representavam os diferentes estágios do seu ciclo de vida no sangue humano (Arrow et al., 2004; Laveran, 1982), nomeando o novo protozoário de *Oscillaria malariae* (Cox, 2010; Schlagenhauf, 2004).

Após os italianos se convencerem da descoberta, passaram a dominar a pesquisa sobre malária. Entre os anos de 1885 e 1890, os malariologistas Camillo Golgi e Ettore Marchiafava conseguiram encontrar uma distinção entre as malárias terçã e quartã, e entre terçã benigna e terçã maligna, tendo como base as observações dos estágios sanguíneos do parasito (Cox, 2010). Além disso, Golgi correlacionou o início dos episódios febris com a liberação dos parasitos no sangue após a ruptura das células infectadas (Arrow et al., 2004). Assim, três espécies foram definidas de acordo com a periodicidade e outras características: *Haemamoeba vivax* (responsável pela malária terçã benigna), *Laverania malariae* (terçã maligna) e *Haemamoeba malariae* (quartã); sendo atualmente conhecidas como *Plasmodium*

vivax, *P. falciparum* e *P. malariae*, respectivamente (Cox, 2010). Uma quarta espécie, muito semelhante ao *P. vivax*, foi descoberta em 1918 por John Stephens durante seu trabalho na África Ocidental e, em 1922, foi descrita como *P. ovale* (Cox, 2010).

Apesar das descobertas sobre a verdadeira causa da malária, os malariologistas ainda não conseguiam desvendar como a doença estava sendo transmitida entre os humanos. Muitas evidências sobre a conexão da malária com os mosquitos se acumularam durante séculos (como já descrito acima), convencendo os malariologistas a investigarem esta questão (Cox, 2010).

Patrick Manson observou que quando as amostras de sangue infectado esfriavam, surgiam as formas flageladas e subsequente fertilização, o que seria mais provável ocorrer fora do corpo humano, provavelmente nos mosquitos (Cox, 2010). Em 1894, Manson começou a pensar na ideia de que a transmissão poderia estar ocorrendo de maneira mecânica pela probóscide do mosquito e, para desvendar este mistério, o médico do exército Ronald Ross foi escolhido para a realização dos experimentos (Cox, 2010). Contudo, seus compromissos militares e transferências para diferentes países fizeram com que a investigação sobre a malária atrasasse. Durante seu trabalho na Índia, no dia 20 de agosto de 1897 (nomeado como “*Mosquito Day*”), Ross encontrou os diferentes estágios de desenvolvimento do parasito no interior dos anofelinos que tinham sido alimentados em um paciente infectado (Arrow et al., 2004; Cox, 2010; Ross, 1897). Infelizmente este estudo não pôde ser concluído devido à transferência de Ross para Calcutá, uma outra cidade indiana com poucos casos de malária. Assim, suas investigações foram realizadas em mosquitos que se alimentavam de pássaros infectados por um tipo específico de *Plasmodium*. Ross publicou seus achados em 1898, quando conseguiu caracterizar com detalhes as diferentes formas do ciclo de vida do parasito, como os esporozoítos presentes na glândula salivar do inseto (Arrow et al., 2004; Cox, 2010). Em 1899, Ross enfim demonstrou, durante seu trabalho em Serra Leoa na África, que a transmissão da malária humana ocorria pela picada de mosquitos, ao descrever o desenvolvimento do *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* no interior dos anofelinos (Cox, 2010). Porém, neste meio tempo, este achado já tinha sido relatado por um grupo de cientistas italianos, entre eles Giovanni Battista Grassi e Amico Bignami, que também mostraram que apenas os mosquitos *Anopheles* fêmeas eram capazes de realizar a transmissão (Arrow et al., 2004; Cox, 2010; Grassi et al., 1899).

Ainda assim, o ciclo de vida do *Plasmodium* nos humanos não tinha sido elucidado completamente pois não sabiam o local onde os parasitos se desenvolviam no período pré-patente, já que não estavam presentes no sangue (Shortt & Garnham, 1948). Em 1948, os estudos de Henry Shortt e Cyril Garnham mostraram que a fase que precedia a infecção no sangue acontecia no fígado, visto tanto em macacos quanto em humanos, ao observar formas pré-eritrocíticas nas biópsias de fígado obtidas nos primeiros dias após a infecção (Shortt et al., 1948; Shortt & Garnham, 1948). Além disso, uma outra questão foi levantada sobre a causa do longo período entre a cura da infecção e o reaparecimento dos parasitos de *P. vivax* no sangue, o que levou, em 1982, à descoberta dos estágios dormentes, chamados de hipnozoítos, encontrados no fígado por Wojciech Krotoski (Krotoski et al., 1982).

2.1.2 Surgimento, distribuição e chegada do Plasmodium ao Novo Mundo

A infecção humana pelo *P. falciparum* tem provável origem a partir da aquisição do parasito de gorilas na África Ocidental, que ocorreu provavelmente há 10.000 anos (Liu et al., 2010). A presença do patógeno acabou sendo um dos principais obstáculos durante a colonização da África pelos portugueses no século XV (Arrow et al., 2004). Já sobre o *P. vivax*, estudos defendem sua origem na África a partir de uma espécie de *Plasmodium* que infecta chimpanzés e gorilas, e que este parasito conseguiu escapar do continente antes da disseminação das populações humanas africanas Duffy negativas, uma característica genética responsável pela resistência à malária vivax (Liu et al., 2014; Loy et al., 2017). A dispersão do *P. vivax* para fora da África ocorreu há cerca de 60.000 anos (Carter, 2003). Contudo, este assunto ainda continua polêmico devido à possibilidade desta espécie ter sua origem no Sudeste Asiático (Daron et al., 2021).

A mobilidade humana foi fundamental para a disseminação da malária pelo mundo (Schlagenhauf, 2004). Acredita-se que a região da Etiópia, na África, seja o local onde a malária surgiu, e pelo caminho do Vale do Nilo e Mediterrâneo se espalhou pelo continente africano atingindo a Ásia e Europa, onde a epidemia teve grande impacto na civilização (Schlagenhauf, 2004). Enquanto no Velho Mundo o pequeno *Plasmodium* causava grandes danos, afetando papas, reis, dizimando populações regionais e destruindo exércitos, o Novo Mundo era o próximo local a ter que enfrentar o parasito (Schlagenhauf, 2004).

Presume-se que o *P. falciparum* e o *P. vivax* chegaram na América do Sul por diferentes rotas (Wiscovitch-Russo et al., 2019). Ainda há controvérsias sobre a forma e a época que a malária vivax chegou no Novo Mundo; uma das teorias era de que o *Plasmodium vivax* tinha desembarcado como uma carga microscópica junto aos migrantes asiáticos, chegando via Estreito de Bering na América do Norte (Arrow et al., 2004), uma rota considerada improvável por muitos (Schlagenhauf, 2004). Contudo, esta entrada nas Américas pode ter acontecido em tempos pré e pós-colombianos junto aos migrantes asiáticos e do Pacífico Ocidental (Carter, 2003). Análises moleculares mostram que o *P. vivax* pode ter sido introduzido na América do Sul pela migração humana vinda da África, Sul da Ásia e Melanésia, contribuindo para a diversidade deste parasito no Novo Mundo, não sendo possível ainda determinar a contribuição Europeia (Rodrigues et al., 2018). Além disso, um outro estudo mostrou que o *P. vivax* da América do Sul está mais relacionado às populações asiáticas, enquanto que o *P. vivax* da América Central tem provável origem africana (Rougeron et al., 2020).

Com relação ao *Plasmodium falciparum*, este provavelmente foi importado da África por múltiplas introduções independentes, entre os séculos XVI e XIX durante o comércio transatlântico de escravos (Arrow et al., 2004; Yalcindag et al., 2012), que possuíam uma maior proteção contra a malária devido às suas defesas genéticas, como anemia falciforme e deficiência de G6PD, assim como imunológicas, adquiridas ao longo vida pela exposição contínua ao parasito (Arrow et al., 2004). Porém, nativos americanos e colonos de ascendência europeia eram mais vulneráveis, e assim, a doença foi se espalhando juntamente com o aumento da reprodução dos mosquitos *Anopheles* devido ao desmatamento e cultivos de arroz (Arrow et al., 2004). Assim, em 1750, dos trópicos da América Latina ao vale do Mississipi e à Nova Inglaterra, as malárias vivax e falciparum já eram comuns (Arrow et al., 2004).

A malária aterrorizou os Estados Unidos até o século XX, atingindo presidentes e centenas de milhares de soldados da Guerra Civil, ganhando muita atenção durante a Segunda Guerra Mundial, quando mais soldados perderam suas vidas para a malária do que para as forças inimigas (Arrow et al., 2004). Por causa da doença, foi fundada a principal agência de saúde pública dos Estados Unidos, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) (Arrow et al., 2004).

2.2 Epidemiologia da malária

Com o fim do Programa Global de Erradicação da Malária em 1969, para que a malária voltasse a ser considerada uma prioridade de saúde pública globalmente, passaram-se quase 30 anos (World Health Organization, 2020). O período de 1969 a 2000 acabou ficando marcado pela sensação de fracasso e abandono da luta contra a malária (World Health Organization, 2020). A doença atingiu centenas de milhões de pessoas no mundo, tirando a vida de dezenas de milhões delas, e somente durante as duas últimas décadas, que representam uma era de ouro na história do controle da malária, o investimento em intervenções contra a doença gerou grandes reduções tanto na incidência quanto na mortalidade causada pela malária (World Health Organization, 2020).

Nos tempos atuais, a malária ainda é considerada um dos maiores problemas de saúde pública, com quase metade da população mundial correndo o risco de contrair a doença. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, estima-se que em 2019 ocorreram 229 milhões de casos de malária em 87 países endêmicos, resultando em 409.000 mortes, das quais 67% representam crianças com menos de 5 anos de idade, o grupo mais vulnerável afetado pela doença (World Health Organization, 2020). A morte por malária pode até parecer um evento raro, em torno de 0,2% de todos os casos clínicos estimados mundialmente, mas por se tratar de uma doença para a qual existe prevenção e tratamento, nem mesmo uma única morte deveria ser aceita (Milner, 2018).

A maioria de todos os casos e mortes por malária no mundo ocorre na África, correspondendo a 94% de ambos e, seguido dela, outras duas localidades que possuem altos índices de malária são o Sudeste Asiático e a região do Mediterrâneo Oriental, que contam com 3% e 2,1%, respectivamente, de todos os casos estimados globalmente (World Health Organization, 2020). Nas Américas, aproximadamente 139 milhões de pessoas em 18 países vivem sob o risco de contrair a malária. Em 2019, foram reportados 723.000 casos e 197 mortes, mas a estimativa é de quase 889.000 casos e 550 mortes. Juntos, Brasil, Colômbia e Venezuela apresentam quase 90% dos casos reportados de malária no continente (World Health Organization, 2020). Na **Figura 1** podemos observar a distribuição da malária no mundo e sua taxa de incidência em cada país, reportada no ano de 2018.

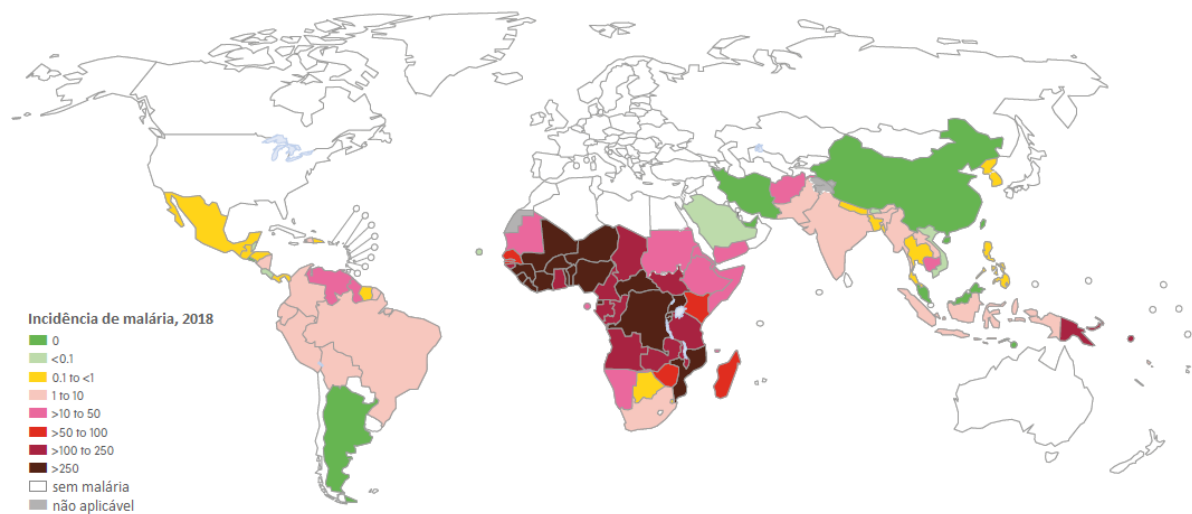


Figura 1 - Mapa da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1.000 habitantes em risco) por país, 2018. Fonte: Adaptado de World Health Organization (2019).

Existem cinco principais espécies de parasitos do gênero *Plasmodium* responsáveis por causar a malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Porém, a maioria das infecções é causada pelo *P. falciparum* e pelo *P. vivax*. O *P. falciparum* é a principal espécie associada com desenvolvimento da malária grave, e conseqüentemente é a responsável pela grande maioria das mortes. Sua incidência é bem maior quando comparada ao *P. vivax*, porém, o *P. vivax* tem uma distribuição geográfica mais ampla (World Health Organization, 2015b).

Na África, a espécie mais prevalente sendo responsável por 99,7% dos casos estimados é o *P. falciparum*, que também conta com 73% dos casos na região do Mediterrâneo Oriental e 68% no Pacífico Ocidental (World Health Organization, 2020). O *P. vivax* representa 3,3% de todos os casos de malária no mundo, dos quais 53% ocorrem na região do Sudeste Asiático, sendo a maioria na Índia (47%). Esta espécie é predominante na região das Américas, responsável por 75% dos casos de malária (World Health Organization, 2019), causando alta morbidade e grandes impactos socioeconômicos (Mueller et al., 2009). Estima-se que 14,3 milhões de casos de malária vivax no mundo ocorram todo ano (Battle et al., 2019).

As outras espécies, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, aparentemente são responsáveis por menos de 1% dos casos de malária registrados em cada região do mundo onde a doença é considerada endêmica (World Health Organization, 2020). Os parasitos *P. malariae* são encontrados nas regiões tropicais e subtropicais, geralmente detectados em infecções mistas (Sutherland, 2016). Costumam não

causar sintomas graves, mas podem resultar em infecções persistentes que podem durar muitos anos, assim como o *P. ovale*, que é uma espécie comum na África Subsaariana, Oceania e na Ásia (Sutherland, 2016).

O *P. knowlesi* é conhecido como a quinta espécie de *Plasmodium* capaz de causar a malária humana, sendo transmitido apenas de macacos para os humanos (White, 2008). Além disso, sua semelhança com o *P. malariae* gerou muitas confusões no diagnóstico, até um estudo descrever um grande foco de infecção na Malásia pelo *P. knowlesi*, identificado por técnicas moleculares (Singh et al., 2004). A infecção por esta espécie parece não ser tão benigna como se pensava, merecendo muita atenção e tratamento adequado (Cox-Singh et al., 2008).

A principal via de transmissão dos plasmódios humanos é pela picada de mosquitos fêmeas infectados do gênero *Anopheles*, sendo 30 espécies conhecidas como vetores importantes dentre as 400 existentes (World Health Organization, 2015b). Outros meios como transfusão sanguínea, de um doador infectado, e transplacentária, da mãe infectada para o feto, são raros mas também podem ser responsáveis pela transmissão (Basu & Sahi, 2017). Nos Estados Unidos, por exemplo, essas transmissões por vias mais raras acontecem, como também por exposições laboratoriais ou até mesmo transmissão local por mosquitos, mas a maioria das infecções ocorre em pessoas que viajaram para áreas endêmicas de malária (Mace et al., 2019). No ano de 2016 foram reportados 2.078 casos, sendo 1.729 originados da África, três casos sem identificação do modo de aquisição, dois casos congênitos e um por transfusão de sangue e, deste total de casos, 14,7% foram classificados como doença grave, ocorrendo 7 mortes (Mace et al., 2019).

2.2.1 A malária no Brasil

O Brasil é o segundo país das Américas com a maior prevalência de casos de malária, representando 22% de todos os casos registrados no continente (World Health Organization, 2020). Em torno de 42 milhões de pessoas vivem sob o risco de contrair malária no Brasil (World Health Organization, 2019). *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* são as espécies circulantes no país, onde existem dois cenários epidemiológicos: a região Amazônica com alta endemicidade concentrando 99% dos casos de malária, e a região extra-Amazônica com hipoendemicidade (Ministério da Saúde (BR), 2019a), onde 80% dos casos notificados são importados de áreas

endêmicas ou até mesmo de outros países endêmicos (Ministério da Saúde (BR), 2020a). Na região extra-Amazônica, os casos ocorrem geralmente em área de Mata Atlântica e, mesmo tendo pequena participação no número total de casos no país, a malária pode evoluir para a forma grave e até mesmo para óbito caso o diagnóstico e tratamento sejam tardios (Ministério da Saúde (BR), 2020c). Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Paraná são os estados com mais casos autóctones de malária na região extra-Amazônica (Ministério da Saúde (BR), 2020c).

A classificação das áreas de risco para adoecer de malária no Brasil segue de acordo com a Incidência Parasitária Anual (IPA): baixo risco (IPA < 10 casos/1.000 habitantes), médio risco (IPA entre 10 e < 50 casos/1.000 habitantes) e alto risco (IPA ≥ 50 casos/1.000 habitantes) (Ministério da Saúde (BR), 2020a). Os locais onde geralmente a transmissão ocorre são em áreas rurais, como as comunidades ribeirinhas, assentamentos, áreas indígenas e garimpos, mas casos nas áreas urbanas e periurbanas também são registrados (Ministério da Saúde (BR), 2020c). A **Figura 2** mostra o mapa do Brasil com as áreas de risco classificadas de acordo com a IPA, sendo bem evidente que o estado do Amazonas é o que possui mais locais com alto risco de transmissão. Na região Amazônica, 36 municípios foram classificados como de alto risco em 2019, com três cidades do estado do Acre fazendo parte deste grupo, sendo elas: Mâncio Lima, Rodrigues Alves e Cruzeiro do Sul (Ministério da Saúde (BR), 2020b).

O registro dos casos de malária na Região Amazônica é feito pelo Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica (Sivep-Malária) e, na região extra-Amazônica, por ser uma doença de notificação compulsória imediata, todo caso suspeito deve ser notificado em até 24 horas para as autoridades de saúde e registrado no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) (Ministério da Saúde (BR), 2020c).

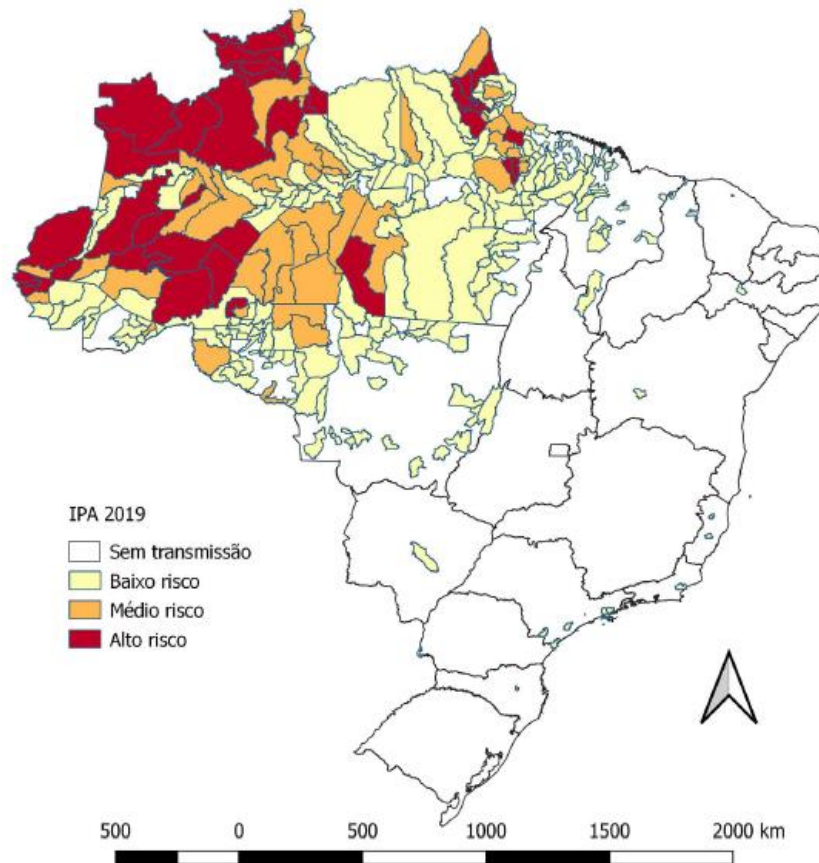


Figura 2 - Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2019*. Fonte: Sivep-Malária e Sinan/Secretaria de vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Data de atualização: 17 de março de 2020. *Dados sujeitos à alteração (Ministério da Saúde (BR), 2020a).

Entre os anos de 2010 e 2016, o número de casos de malária no Brasil teve uma redução bastante expressiva, caindo de quase 390.000 para em torno de 135.000 casos estimados (World Health Organization, 2019). Contudo, em 2017 houve um aumento em torno de 50% do número de casos em relação ao ano de 2016 (Ministério da Saúde (BR), 2020a). Em 2018, foram notificados 193.838 casos de malária na região Amazônica, uma redução de apenas 1% em relação ao ano anterior, e 734 casos na região extra-Amazônica, um aumento que representa 44,2% (Ministério da Saúde (BR), 2020a). Os dados de 2019 demonstraram uma redução de 19,1% (comparado ao ano de 2018) no total de casos de malária, com 157.454 casos registrados em ambas regiões do país (Ministério da Saúde (BR), 2020b). A espécie mais prevalente no Brasil é o *P. vivax*, que no ano de 2019 foi responsável por 89,3% dos casos autóctones, com o restante dos casos, 10,7%, sendo causados pelo *P. falciparum* e por infecções mistas (Ministério da Saúde (BR), 2020b). Na **Figura 3** é possível visualizar a variação do número total de casos de malária registrados e de

acordo com cada espécie, ao longo dos anos de 1959 a 2019 (Ministério da Saúde (BR), 2020a).

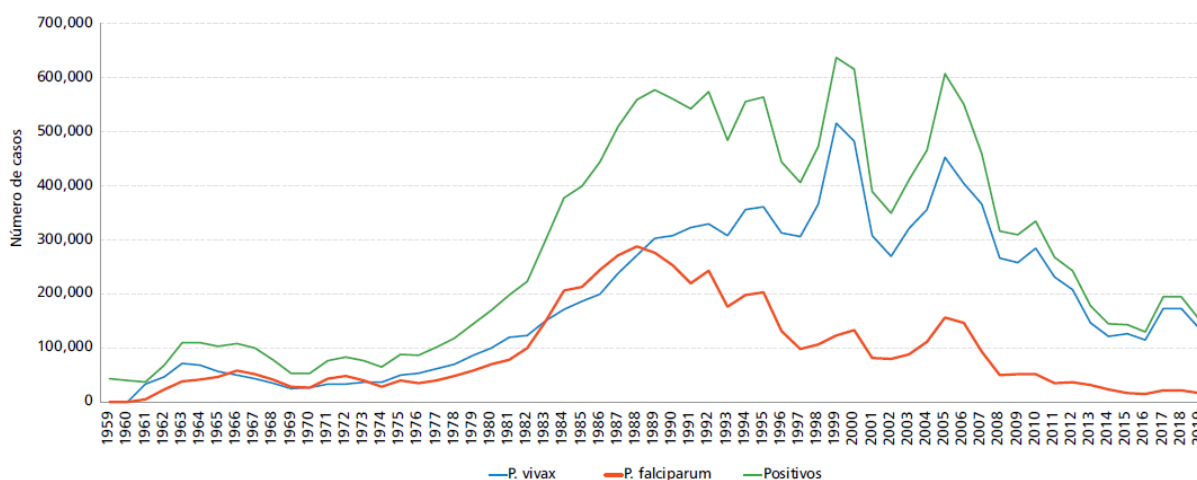


Figura 3 - Casos de malária notificados segundo espécie parasitária, Brasil, 1959-2019*. Fonte: Sivep-Malária e Sinan/Secretaria de vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Data de atualização: 17 de março de 2020. *Dados sujeitos à alteração (Ministério da Saúde (BR), 2020a).

Complicações da malária podem ocorrer necessitando de internações hospitalares. Em 2019, um total de 1.912 internações foram registradas, um número que representou uma queda de 12,2% em relação ao ano anterior. Sobre a mortalidade, em 2019 foram registrados 37 óbitos (Ministério da Saúde (BR), 2020b), um cenário bem diferente daquele visto no ano de 1991, quando mais de 40.000 internações e quase 800 óbitos por malária foram registrados no Brasil (Ministério da Saúde (BR), 2020a). Em 2019, a letalidade da doença na região amazônica foi de 0,02%, e na região extra-amazônica foi de 2,04%, mais de 100 vezes maior do que na região amazônica, principalmente devido à demora pela suspeição de malária, o que leva ao agravamento do quadro do paciente (Ministério da Saúde (BR), 2020b).

2.2.2 O impacto da malária no genoma humano: seleção de variantes genéticas que conferem proteção contra a doença

Devido à forte pressão seletiva da malária, o genoma humano tem sido moldado. Diversas regiões geográficas mostram populações humanas com diferentes variações genéticas que se adaptaram para uma forma de resistência contra a doença, como no caso da hemoglobina S, talassemia, deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), entre outros defeitos eritrocitários que se tornaram comuns

nos humanos (Carter & Mendis, 2002; Kariuki & Williams, 2020; Kwiatkowski, 2005). Esta seleção positiva é esperada quando uma variante genética aparece numa área endêmica e protege o indivíduo contra uma doença, como no caso da malária, aumentando a frequência da população que carrega a variante (Ohashi et al., 2004).

Na África, a malária serviu como seleção para a sobrevivência daqueles com traço falciforme, que carregam apenas um gene da hemoglobina S (Hb AS), pois ao possuírem células vermelhas contendo este tipo de hemoglobina, estavam mais protegidos da doença (Bayoumi, 1987), com um risco 10 vezes menor de desenvolver a malária grave quando comparados aos indivíduos portadores dos dois genes normais da hemoglobina A (Hb AA) (Kwiatkowski, 2005). Com relação aos indivíduos homocigotos Hb SS, que são raros, estes frequentemente desenvolvem uma anemia muito grave levando a óbito (Bayoumi, 1987). Fica evidente que a pressão seletiva exercida pela malária neste caso foi muito forte, pelo fato deste alelo da hemoglobina S ter se tornado bastante frequente nas populações expostas à doença, mesmo com o risco das consequências fatais para os indivíduos homocigotos (Carter & Mendis, 2002; Kwiatkowski, 2005). O gene da HbS está distribuído amplamente na África Subsaariana, Oriente Médio e partes do subcontinente Indiano, onde a frequência de portadores varia de 5 a 40%, ou mais, da população (Weatherall & Clegg, 2001).

Uma outra variante de hemoglobina encontrada em regiões africanas endêmicas para *P. falciparum*, com baixa prevalência da HbS, é a hemoglobina C (HbC), altamente frequente no grupo étnico Dogon do Mali, onde foi observada uma maior proteção contra a malária grave nos indivíduos portadores desta hemoglobina (Agarwal et al., 2000). Diferente das hemoglobinas S e C, a variante hemoglobina E (HbE) está concentrada no Sudeste Asiático, tendo uma frequência de 50% em alguns lugares (Kwiatkowski, 2005), uma condição que mostrou proteção contra a hiperparasitemia e desenvolvimento da malária falciparum grave (Chotivanich et al., 2002), como também prevenção da infecção pelo *P. vivax*, que possivelmente foi o principal agente da seleção do gene da HbE nestas regiões antes da chegada do *P. falciparum* (Carter & Mendis, 2002).

As talassemias possuem uma alta incidência em diversas regiões, como Mediterrâneo, partes da África, Oriente Médio, subcontinente Indiano, Sudeste da Ásia, Melanésia e nas Ilhas do Pacífico, podendo estar presente em até 80% de algumas populações (Weatherall & Clegg, 2001). Estudos mostraram que a alfa-

talassemia confere vantagem contra a malária falciparum, protegendo os indivíduos da forma grave da doença (Mockenhaupt et al., 2004; Williams et al., 2005).

G6PD é uma enzima muito importante contra o estresse oxidativo, que ocorre no interior dos eritrócitos sendo gerado principalmente pelos parasitos da malária após o processamento da hemoglobina (Kwiatkowski, 2005). Existem muitas variantes da G6PD, e quando alguma compromete sua atividade enzimática pode resultar em anemia hemolítica (Kwiatkowski, 2005). A deficiência de G6PD tem uma distribuição mundial heterogênea, porém, muito prevalente nas áreas endêmicas de malária (Howes et al., 2012) tendo correlação com a proteção contra a doença, o que também suporta a hipótese de seleção positiva (Carter & Mendis, 2002; Kwiatkowski, 2005). Estima-se uma frequência de 8% de portadores do alelo relacionado à deficiência de G6PD nas áreas endêmicas para malária, e apesar da predição de alta prevalência na África Subsaariana, a maior densidade populacional portadora se encontra na Ásia (Howes et al., 2012). Uma das hipóteses sobre o mecanismo de proteção que a deficiência de G6PD proporciona é o aumento da fagocitose dos eritrócitos infectados com as formas mais jovens do parasito, que apresentam danos na membrana devido ao estresse oxidativo gerado nestas células (Cappadoro et al., 1998).

Na África Subsaariana, onde há maior predominância de malária causada pelo *P. falciparum*, uma característica genética importante presente nesta população é a negatividade de Duffy, que parece excluir a malária vivax desta região (Mueller et al., 2009). Duffy é um receptor de quimiocina expresso em diversos tipos celulares, codificado pelo gene *FY* (Kwiatkowski, 2005), e a falta da expressão desta glicoproteína nos eritrócitos previne a invasão pelo *P. vivax*, o que consideravelmente colaborou para a ausência desta espécie em muitas regiões da África (Miller et al., 1976). Apesar desta proteção ser questionada pelo fato da detecção de infecção em indivíduos Duffy negativos, tanto na África (Ryan et al., 2006) como no Brasil (Cavasini et al., 2007), esta hipótese de proteção relacionada a uma característica hereditária é amplamente aceita (Mueller et al., 2009). Além da forte pressão seletiva no locus *FY* da população africana, uma nova forma alélica que confere negatividade para Duffy surgiu na Papua Nova Guiné, onde foi observado uma correlação desta diminuição da expressão do antígeno Duffy com a resistência à infecção pelo *P. vivax* (Michon et al., 2001; Zimmerman et al., 1999), sugerindo o envolvimento desta espécie na seleção deste polimorfismo. Na África Central e Ocidental, a negatividade de Duffy é quase universal na maioria das populações, tendo uma frequência que ultrapassa 97%, não

sendo uma surpresa o fato da malária vivax ser muito rara nestas regiões (Carter & Mendis, 2002). O conhecimento sobre a associação destas características genéticas com a malária pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle, assim como na proteção dos ensaios clínicos contra as confusões geradas pelos fatores genéticos (Mueller et al., 2009).

2.3 Ciclo de vida do *Plasmodium*

Os parasitos causadores da malária possuem um ciclo de vida muito complexo, que só foi elucidado graças à persistência dos diversos malariologistas que se dedicaram à pesquisa ao longo de muitos anos. Durante o ciclo (**Figura 4**), o parasito passa por mais de dez estágios de diferenciação celular, invade no mínimo quatro tipos celulares e isso tudo envolvendo dois hospedeiros diferentes (Mueller et al., 2009).

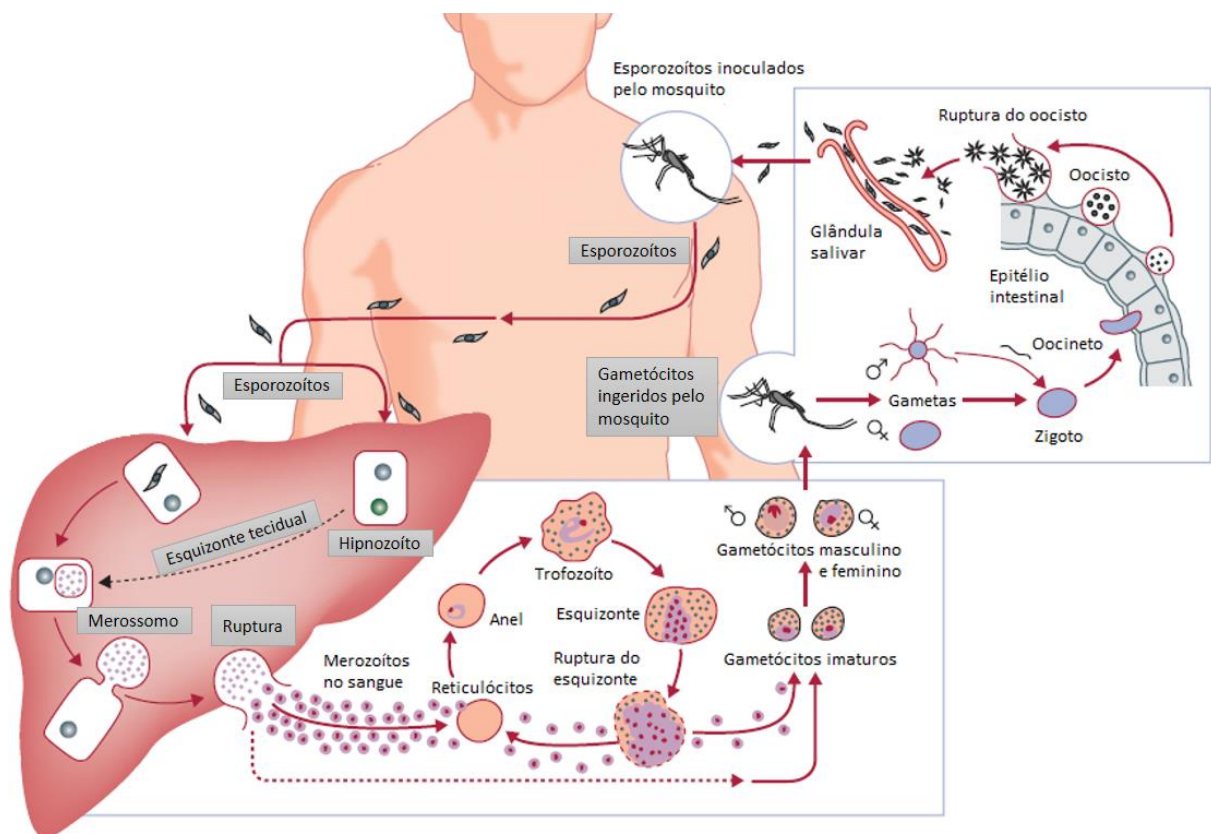


Figura 4 - Ciclo de vida do *Plasmodium vivax*. Fonte: Adaptado de Mueller et al. (2009).

A infecção nos humanos ocorre durante o repasto sanguíneo realizado por um mosquito fêmea infectado do gênero *Anopheles*, que obtém nutrientes presentes no

sangue para a maturação de seus ovos. No momento em que o inseto insere sua probóscide na pele, componentes da saliva como anti-histamínicos, vasodilatadores, anticoagulantes e imunomoduladores são injetados (Zheng et al., 2014) facilitando a captação do sangue presente nos capilares. Assim, juntamente com a saliva, em torno de 50 parasitos infectantes denominados esporozoítos, presentes nas glândulas salivares dos mosquitos, são também inoculados (Ménard et al., 2013). Os esporozoítos possuem grande capacidade motora podendo invadir vasos linfáticos e sanguíneos, como também ficar retidos na derme e serem drenados para os linfonodos e conseqüentemente degradados (Amino et al., 2006). Aqueles que sobrevivem, e principalmente os que diretamente caem na circulação sanguínea, em questão de poucos minutos conseguem migrar para o fígado e iniciar o ciclo pré-eritrocítico no hospedeiro vertebrado, que tem uma duração de aproximadamente 7 a 10 dias após a inoculação do parasito (Gowda & Wu, 2018; Ménard et al., 2013). Ao infectar os hepatócitos, ocorre a diferenciação em esquizontes teciduais, e dezenas de milhares de replicações mitóticas se iniciam dentro de cada célula infectada, um processo conhecido como esquizogonia (Mueller et al., 2009). Durante esta fase hepática, que corresponde ao período de incubação, o indivíduo é assintomático e não transmissor (Basu & Sahi, 2017). Alguns parasitos podem permanecer no fígado e se diferenciar em hipnozoítos, um estágio dormente encontrado nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, que pode ser reativado depois de alguns meses ou anos, sendo responsável pelas recaídas (Basu & Sahi, 2017; Mueller et al., 2009). Ainda é desconhecido o determinante biológico que comanda o desenvolvimento ativo ou latente do parasito, assim como o fator desencadeador para a ativação dos hipnozoítos, mas acredita-se que para este último o estresse pode exercer algum papel, garantindo a transmissão e propagação da espécie (Mueller et al., 2009).

Após a multiplicação no interior dos hepatócitos os merozoítos gerados são liberados para a corrente sanguínea dentro de vesículas, chamadas de merossomos, dando início ao ciclo eritrocítico (Ménard et al., 2013). Nesta fase, os merozoítos invadem as células vermelhas do sangue, se transformam em trofozoítos jovens (a forma de anel), depois em trofozoítos maduros e então iniciam a esquizogonia para formar o esquizonte (Basu & Sahi, 2017). A esquizogonia é definida como o crescimento seguido pela divisão nuclear e celular, que resulta em numerosas células filhas dentro de uma única célula mãe, culminando com a liberação e reinvasão de novas células hospedeiras pelas células filhas, gerando episódios sucessivos de

multiplicação (Carter & Mendis, 2002). Dessa forma, os esquizontes se transformam em merozoítos, que são liberados pelo rompimento dos eritrócitos para que possam invadir novas células vermelhas, mantendo a continuidade do ciclo sanguíneo, uma fase que também é responsável pelo aparecimento dos sinais e sintomas da doença denominado paroxismo malárico (Basu & Sahi, 2017). Quando infectados pelo *P. vivax*, cada eritrócito libera de 12 a 18 merozoítos, e na infecção pelo *P. falciparum* este número é de 8 a 24 merozoítos (Gowda & Wu, 2018). O *P. vivax* infecta preferencialmente células jovens conhecidas como reticulócitos, já o *P. falciparum* invade eritrócitos de todas as idades. Esta preferência de célula hospedeira do *P. vivax* pode ser uma adaptação para limitar a hiperparasitemia e a virulência associada, já que a frequência de reticulócitos no sangue é de 1 a 2% dos eritrócitos. Além disso, estas células também podem estar fornecendo um microambiente especial que favorece a multiplicação desta espécie (Mueller et al., 2009).

Alguns parasitos sanguíneos sofrem uma diferente transformação dando origem aos gametócitos feminino e masculino, as únicas formas transmissíveis que, quando ingeridas pela picada de um anofelino fêmea, iniciam a outra fase essencial do ciclo de vida, que ocorre neste hospedeiro invertebrado definitivo. No caso do *P. vivax*, gametócitos maduros podem se desenvolver antes mesmo do aparecimento da doença clínica, o que confere uma vantagem por ser transmitido ao inseto vetor antes da administração do tratamento, que geralmente é realizado quando o indivíduo infectado apresenta os sinais e sintomas da malária (Mueller et al., 2009). Após a ingestão do sangue pelo mosquito, devido à temperatura mais baixa dos insetos e ao pH do seu trato digestivo, os gametócitos femininos se diferenciam em macrogametas, e os gametócitos masculinos em 8 microgametas, após um processo de exflagelação (Vinetz, 2005). Com a fusão destes gametas o zigoto é formado, o único estágio diploide do parasito que, após um evento de meiose, dá origem ao oocineto, uma forma móvel que produz as enzimas necessárias para atravessar a membrana peritrófica que reveste o intestino médio (Langer & Vinetz, 2001). Ao chegar no lado luminal da membrana basal, o oocineto se aloja neste espaço e se diferencia em oocisto, que inicia o processo de esporogonia com milhares de divisões mitóticas dando origem aos esporozoítos que, após o rompimento do oocisto, caem na hemolinfa e migram até a glândula salivar do inseto (Mueller et al., 2009), sendo capazes de infectar o hospedeiro vertebrado caso este inseto infectado realize um novo repasto sanguíneo, dando assim continuidade ao ciclo de vida do parasito.

2.4 Diagnóstico, tratamento e prevenção da malária

Durante as várias etapas do ciclo do *Plasmodium* é possível identificar diferentes ações que podem ser implementadas para auxiliar na interrupção da doença e da transmissão, assim como na prevenção da própria infecção.

2.4.1 Métodos de diagnóstico

Um diagnóstico rápido e preciso da infecção pelo *Plasmodium* é fundamental para a indicação do tratamento correto, reduzindo a morbidade assim como a mortalidade (Basu & Sahi, 2017), além de interromper a continuidade do ciclo do parasito. Associar os critérios clínicos e epidemiológicos auxilia na indicação para a realização do exame e confirmação da infecção (Ministério da Saúde (BR), 2005).

O método mais utilizado e considerado padrão ouro para o diagnóstico de malária é o exame microscópico de gota espessa, obtido por uma amostra de sangue colhida por punção digital ou venosa sem adição de anticoagulante. Após a secagem da lâmina contendo a amostra, se realiza a coloração com azul de metileno e Giemsa. Esta técnica é de baixo custo, permitindo identificar a espécie do plasmódio, além da estimativa da parasitemia por volume de sangue (μL ou mm^3) (Ministério da Saúde (BR), 2005). Contudo, a leitura da lâmina deve ser realizada apenas por técnicos bem treinados que, além de saberem identificar as diferentes formas e espécies de *Plasmodium*, recebem treinamento sobre manipulação e cuidados com o microscópico, assim como instruções do modo de leitura e contagem. A análise de 100 campos utilizando um aumento de 100X com óleo de imersão é sugerida, e caso o diagnóstico seja negativo, mas com forte suspeita de malária, é recomendado o retorno do paciente para uma nova coleta em diferentes horários, principalmente durante o auge da febre, para aumentar a sensibilidade do exame (Basu & Sahi, 2017; Ministério da Saúde (BR), 2005; World Health Organization, 2015a).

Na circulação periférica são encontradas todas as formas do estágio sanguíneo do *P. vivax*, assim como a maioria das espécies de *Plasmodium*. Por outro lado, as formas sanguíneas maduras do *P. falciparum*, por possuírem capacidade de citoaderência a uma variedade de receptores, acabam sendo sequestradas na vasculatura de vários órgãos e tecidos (Mueller et al., 2009), não podendo ser visualizadas nas lâminas de diagnóstico na maioria das vezes.

Além da gota espessa, o esfregaço delgado (distendido) também pode ser utilizado como diagnóstico por microscopia, o qual permite uma melhor visualização das características morfológicas dos eritrócitos parasitados, pelo fato das hemácias serem fixadas antes da coloração, oferecendo uma alta especificidade. Porém, a gota espessa é mais sensível por concentrar uma maior quantidade de amostra, aumentando a chance do encontro dos parasitos (Ministério da Saúde (BR), 2005).

Apesar das grandes vantagens do diagnóstico por microscopia, este se torna inviável em locais com serviços de saúde precários e com difícil acesso da população aos centros de diagnóstico (Ministério da Saúde (BR), 2005). Diante disso, o uso de testes rápidos imunocromatográficos acaba sendo a melhor escolha nestas situações. Estes testes detectam antígenos ou enzimas específicas para o gênero ou espécie de *Plasmodium*, sendo muito sensíveis quando a carga parasitária é alta (Basu & Sahi, 2017). Porém, alguns testes podem dar resultados positivos em indivíduos já tratados da doença, devido à detecção de antígenos que permanecem circulantes por tempo prolongado (Ministério da Saúde (BR), 2005).

O diagnóstico da infecção pelo *Plasmodium* também pode ser realizado por técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), que detecta o material genético do parasito. Esta técnica é a mais sensível em comparação com a microscopia e teste rápido, sendo capaz de detectar casos de baixa parasitemia não identificados por estes outros dois métodos mais convencionais (Mfuh et al., 2019). Apesar da PCR apresentar grande eficiência, ela não é utilizada na rotina de diagnóstico dos casos de malária nos centros e postos de saúde das áreas endêmicas, pois ainda apresenta custo elevado de reagentes e equipamentos, como também é uma técnica de alta complexidade (Ministério da Saúde (BR), 2005), e que exige um tempo maior para a emissão do resultado.

2.4.2 Tratamento da malária

Em todo o Brasil, os medicamentos antimaláricos são disponibilizados gratuitamente nas unidades de saúde do Sistema Único de Saúde (SUS), e assim como o diagnóstico, o tratamento não está exclusivamente ao encargo de farmacêuticos-bioquímicos e médicos, mas também de profissionais e técnicos qualificados, garantindo um fácil acesso até mesmo nas regiões mais remotas e carentes de médicos (Ministério da Saúde (BR), 2020c).

Vários estágios do ciclo do parasito podem ser atingidos pelo tratamento, como: interrupção da esquizogonia sanguínea, prevenindo a progressão da doença; destruição dos hipnozoítos, evitando as recaídas; e eliminação dos gametócitos, impedindo a transmissão do parasito (Basu & Sahi, 2017; Ministério da Saúde (BR), 2020c). O tipo de medicamento, dose e tempo de tratamento são escolhidos de acordo com as recomendações fornecidas pelo Ministério da Saúde, que variam conforme a idade, peso, período gestacional e alguma particularidade do paciente, garantindo uma boa eficácia e baixa toxicidade do tratamento (Ministério da Saúde (BR), 2020c).

Para infecções por *P. vivax* e *P. ovale* usa-se a combinação de dois medicamentos, cloroquina e primaquina, sendo esta última a que age contra os hipnozoítos e gametócitos. Um tratamento diferente e específico é oferecido às gestantes e crianças com menos de 6 meses de idade, que não podem fazer o uso da primaquina, como também para as pessoas com deficiência de G6PD, que devem ser tratados com cautela pelo fato da primaquina causar hemólise, anemia grave, entre outras complicações (Ministério da Saúde (BR), 2020c).

O tratamento da malária causada por *P. malariae* é apenas com cloroquina (Ministério da Saúde (BR), 2020c). Já para *P. falciparum* é recomendada uma terapia combinada com derivados de artemisinina, que rapidamente elimina os parasitos sanguíneos assim como os gametócitos, enquanto a outra droga da combinação, além de ajudar na eliminação dos parasitos restantes, previne o desenvolvimento de resistência aos medicamentos (Basu & Sahi, 2017). As combinações utilizadas no Brasil são artesunato/mefloquina ou artemeter/lumefantrina, com a administração de uma dose única de primaquina no primeiro dia do tratamento, exceto nas gestantes e em menores de 6 meses de idade (Ministério da Saúde (BR), 2020c).

No caso de infecções mistas, como as combinações artesunato/mefloquina ou artemeter/lumefantrina são capazes de eliminar os esquizontes sanguíneos de todas as espécies, se faz uma associação com a primaquina por sete dias, para o tratamento eficaz da infecção por *P. vivax*, exceto para as gestantes e menores de 6 meses de idade (Ministério da Saúde (BR), 2020c).

Recentemente, a nova droga tafenoquina foi aprovada para uso com a intenção de prevenir as recaídas causadas pelo *P. vivax*, que mesmo em dose única mostrou grande eficácia e segurança (Lacerda et al., 2019).

Mesmo com o tratamento correto, situações de recorrência da infecção podem ocorrer e, nestes casos, outros esquemas terapêuticos são recomendados. Já

aqueles que apresentam malária complicada, são considerados de emergência médica e devem ser tratados preferencialmente em alguma unidade hospitalar de referência, onde exames laboratoriais e clínico-neurológicos são realizados, assim como o tratamento injetável, com o principal objetivo de evitar a morte do paciente (Ministério da Saúde (BR), 2020c).

2.4.2.1 Resistência do parasito ao tratamento

O aparecimento de resistência do *P. vivax* à cloroquina em diversos países de área endêmica é um desafio para a saúde pública, que deve detectar e mensurar a progressão deste fenômeno (Mueller et al., 2009). Desde o ano de 1946, a cloroquina tem sido utilizada como terapia de primeira linha para malária vivax (Baird, 2004). A combinação de drogas para o tratamento da malária parece diminuir as chances do surgimento de resistência. Regiões onde a deficiência de G6PD é comum, a primaquina não é amplamente utilizada pelo risco de causar hemólise, como no caso da Melanésia e partes do Sudeste Asiático, onde a resistência à cloroquina surgiu e se espalhou (L. A. Gonçalves et al., 2014). Porém, mesmo em países onde a cloroquina e primaquina são coadministradas, como na América Latina, casos de resistência à terapia têm sido identificados (L. A. Gonçalves et al., 2014).

A resistência do *P. falciparum* à cloroquina foi identificada por volta do ano de 1950, e hoje é considerada a nível global (Baird, 2004). Já pelo *P. vivax*, até 1989 não se tinha conhecimento da sua resistência, sendo detectada pela primeira vez na Papua Nova Guiné (Rieckmann et al., 1989). Na América do Sul, a primeira evidência de infecções por *P. vivax* resistentes à cloroquina foi publicada em 1996, na Guiana e, no Brasil, no ano de 2000 (Ferreira & Castro, 2016).

A transmissão dos gametócitos de *P. vivax* mediada pelos indivíduos assintomáticos não tratados pode explicar o porquê a resistência à cloroquina apareceu em *P. vivax* quase 40 anos após a detecção de resistência do *P. falciparum*. O fato dos gametócitos de *P. vivax* poderem ter sofrido uma menor pressão seletiva pela droga pode ter reduzido a chance da transmissão de parasitos com mutações que conferem resistência (Mueller et al., 2009).

2.4.3 Medidas de prevenção da malária

Com o conhecimento sobre como ocorre a transmissão do parasito, comportamento do vetor, e os locais de maior risco, muitas ações e atitudes podem ajudar na prevenção da doença, como: medidas de controle vetorial (uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas, pulverização residual interna, manejo dos criadouros de mosquitos e nebulização espacial); proteção pessoal (uso de repelentes, roupas longas que cubram áreas expostas do corpo); e melhorias ambientais (como a estrutura do domicílio) (Castro, 2017). Outra medida de prevenção é a quimioprofilaxia, contudo, no Brasil, não é indicada para viajantes pelo fato da rede de diagnóstico e de tratamento estar amplamente distribuída no país e, além disso, a eficácia contra o *P. vivax*, a espécie mais predominante na região, é baixa (Ministério da Saúde (BR), 2020c).

Um importante reservatório para novas infecções e que escapa das medidas de controle de malária é o hipnozoíto, capaz de resistir a muitas intervenções quimioprofiláticas e quimioterapêuticas, permitindo a continuidade do ciclo nos humanos, uma forma enigmática do parasito que necessita de avanços sobre seu conhecimento e novas estratégias para sua eliminação (Mueller et al., 2009).

Mesmo com a maioria das medidas de prevenção à disposição, a falta de conhecimento da população e de percepção sobre o risco da doença tem grande impacto nas estratégias de controle em muitas regiões endêmicas. Um estudo realizado no Brasil mostrou exatamente esta questão, onde o comportamento da população de uma área endêmica é influenciado por percepções negativas e falta de conhecimento sobre a etiologia da doença, agindo como uma barreira nas tentativas de controle e eliminação da malária (Murta et al., 2019). Tanto os pacientes como os profissionais de saúde desta região acreditam que apenas com o desenvolvimento de uma vacina a eliminação da malária será possível (Murta et al., 2019). Atualmente, a única vacina disponível é contra a malária falciparum, e que está sendo implementada em alguns países da África; um tema que será abordado mais adiante (no tópico 2.10).

2.5 Manifestações clínicas e patogenia da malária

O tempo para a manifestação dos sinais e sintomas da malária varia de acordo com as espécies. Para o *P. falciparum*, o período de incubação é de 8 a 12 dias; *P.*

vivax, 13 a 17 dias; e *P. malariae*, 18 a 30 dias (Ministério da Saúde (BR), 2020c). Após este período, o indivíduo pode apresentar o clássico paroxismo malárico, que é a crise aguda da malária caracterizada pelos episódios de calafrio, febre e sudorese, que ocorre devido à lise dos eritrócitos infectados para a liberação dos merozoítos (Basu & Sahi, 2017) associado com os altos níveis de citocinas circulantes produzidas pela ativação do sistema imune (Gazzinelli et al., 2014). O *P. falciparum*, por invadir eritrócitos de todas as idades, pode resultar em parasitemias com uma frequência de 20 a 30% de células infectadas, já o *P. vivax*, por infectar somente reticulócitos, causa uma parasitemia que raramente excede 2%, resultando numa baixa biomassa de parasitos (Dayanand et al., 2018). O intervalo entre os episódios de paroxismo, que geralmente coincide com o tempo de um ciclo eritrocítico, pode acontecer a cada 48 horas (febre terçã) para as infecções por *P. vivax*, *P. ovale* e *P. falciparum*, ou 72 horas (febre quartã) para *P. malariae* (Basu & Sahi, 2017), porém nem sempre este padrão é observado (Ministério da Saúde (BR), 2020c). Os paroxismos podem ser acompanhados por cefaleia, mialgia, dor abdominal, dor nas costas, náuseas, vômitos, palidez e icterícia, sendo a febre geralmente alta podendo chegar a 40° C e passar a ser intermitente após os primeiros paroxismos (Basu & Sahi, 2017; Ministério da Saúde (BR), 2020c). A febre alta é mais comum na malária vivax, sendo induzida por níveis mais baixos de parasitemia quando comparada com a malária falciparum (Price et al., 2007). Todos estes sinais e sintomas são muito semelhantes aos de outras doenças febris, como as virais, dificultando o diagnóstico clínico da doença (Basu & Sahi, 2017; Ministério da Saúde (BR), 2020c; World Health Organization, 2015a).

A malária pode se manifestar de maneira diferente de acordo com a espécie do parasito, nível de parasitemia, tempo de doença, imunidade adquirida, idade e fator genético (Basu & Sahi, 2017; Ministério da Saúde (BR), 2020c). Os principais fatores que levam ao desenvolvimento da doença são: altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, citoaderência de eritrócitos infectados, e a remoção no baço das células vermelhas parasitadas e alteradas (Gazzinelli et al., 2014). Assim, de acordo com sua progressão, a malária ainda pode ser classificada como não complicada e complicada, estando as gestantes, crianças e primoinfectados mais sujeitos à gravidade, principalmente quando a infecção é causada pelo *P. falciparum* (Ministério da Saúde (BR), 2020c).

2.5.1 Complicações da malária

A classificação da malária como uma doença grave e complicada segue de acordo com as diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS). Estes casos devem ser considerados quando o paciente apresenta uma ou mais das manifestações clínicas e laboratoriais, como: dor abdominal intensa, icterícia, cianose, consciência prejudicada, convulsões, comorbidades descompensadas, anemia grave, hipoglicemia, acidose metabólica, insuficiência renal, hiperparasitemia, entre outras mais (Ministério da Saúde (BR), 2020c; World Health Organization, 2015a). O único critério que não é levado em conta para a classificação de uma malária grave causada pelo *P. vivax* é a hiperparasitemia (World Health Organization, 2015a). Já as malárias por *P. ovale* e *P. malariae* não costumam evoluir para casos complicados (Basu & Sahi, 2017).

A malária grave está mais associada à infecção pelo *P. falciparum*, porém, aquelas causadas pelo *P. vivax* também podem evoluir para um quadro mais grave e até mesmo à morte, não podendo mais ser tratada como uma doença benigna. Casos de malária vivax grave se assemelham aos da malária falciparum, que envolvem: malária cerebral, disfunção hepática, lesão pulmonar aguda, síndrome do desconforto respiratório agudo, edema pulmonar, choque, insuficiência renal, ruptura esplênica, trombocitopenia e hemorragia grave, e anemia grave (Anstey et al., 2012; Mueller et al., 2009).

As diversas complicações podem aparecer principalmente devido à capacidade de citoaderência dos eritrócitos infectados ao endotélio, que levam ao sequestro celular na microvasculatura, tendo um papel importante na patogenia da malária (Anstey et al., 2012) principalmente por causar obstruções microvasculares, hipóxia e inflamação (Dayanand et al., 2018). Este fenômeno é muito característico nas infecções por *P. falciparum*, já que as formas maduras do parasito não são encontradas nas amostras de sangue periférico (Anstey et al., 2012). O sequestro de parasitos pode ocorrer em vários órgãos como coração, pulmão, cérebro, fígado, rim, tecidos subcutâneos e placenta (Miller et al., 2002). Como as formas maduras de *P. vivax* podem ser observadas nas amostras sanguíneas, este sequestro provavelmente não estaria acontecendo (Anstey et al., 2012). Contudo, estudos *in vitro* mostraram que o *P. vivax* possui capacidade de citoaderência nas células endoteliais e placentárias (Carvalho et al., 2010; Chotivanich et al., 2012), e relatos do encontro de

acúmulos de eritrócitos infectados por *P. vivax* na microvasculatura de autópsias também foram publicados (Anstey et al., 2012).

Uma das complicações da malária frequentemente encontrada é a anemia grave, e um dos fatores relacionados é a remoção dos eritrócitos pelo baço. Se por um lado este papel é muito importante para a proteção da infecção, por outro, ao remover eritrócitos não infectados acaba contribuindo para a patogênese (Moxon et al., 2020). Na malária vivax, a alta resposta inflamatória no baço parece ser um dos fatores importantes para a anemia (Dayanand et al., 2018). A taxa de destruição de eritrócitos não infectados é maior na malária vivax do que na malária falciparum (Anstey et al., 2012), o que resulta em grandes perdas de eritrócitos causando anemia grave (Dayanand et al., 2018). Além disso, as recaídas da infecção por *P. vivax* têm grande papel na progressão da anemia por estarem associadas aos recorrentes episódios de hemólise e prejudicada eritropoiese, que ocorrem antes da recuperação hematológica do paciente (Price et al., 2007).

Infecções por *P. falciparum* e *P. vivax* são responsáveis por complicações durante a gravidez, causando anemia, aborto espontâneo, baixo peso ao nascer, como também malária congênita (Milner, 2018). O sequestro de parasitos na placenta ocorre na malária falciparum, causando alterações patológicas e comprometimento das trocas materno-fetal (Price et al., 2007). No caso da malária vivax, esse sequestro parece não acontecer (Anstey et al., 2012; Price et al., 2007), mas estudos histopatológicos mostraram acúmulo de eritrócitos parasitados e depósito de hemozoína na placenta, com respostas inflamatórias e disfunção microvascular que interferem na hemodinâmica uteroplacentária assim como no crescimento fetal (Dayanand et al., 2018).

As coinfeções de *Plasmodium* com outros patógenos podem ser encontradas. Nos casos de coinfeções bacterianas ou virais, há uma forte contribuição para a morbidade por serem capazes de intensificar as respostas inflamatórias, aumentando o risco do desenvolvimento de malária grave (R. M. Gonçalves et al., 2014). Por outro lado, as coinfeções com helmintos invasores de tecidos parecem proteger contra as complicações da doença, principalmente pelo seu efeito imunomodulador que medeia a supressão da resposta imune (R. M. Gonçalves et al., 2014).

No Brasil, casos de malária vivax complicada já foram registrados e as observações mostram que uma atenção especial deve ser dada às gestantes e pacientes com comorbidades pelo alto risco de complicações (Siqueira et al., 2015).

2.6 Mecanismos de evasão do *Plasmodium*

O *Plasmodium* possui diferentes estratégias de sobrevivência para que o estágio de gametócito seja atingido, garantindo a sua transmissão e continuidade do ciclo de vida (Deroost et al., 2016). Desde os primeiros estágios da infecção, os parasitos possuem mecanismos de escape. Os esporozoítos, por exemplo, são capazes de suprimir as funções imunes das células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado) garantindo sua passagem em segurança para a camada de células hepáticas (Zheng et al., 2014). Ao infectar os hepatócitos, os esporozoítos se alojam dentro de vacúolos parasitóforos, para evitar a degradação pelos lisossomos, e interferem no mecanismo de exposição da fosfatidilserina (um marcador de apoptose) inibindo sua expressão na superfície da célula, o que impede a fagocitose desses hepatócitos infectados (Zheng et al., 2014). Com a diferenciação em merozoítos, para atingir a circulação sanguínea sem serem atacados pelos fagócitos, a saída em forma de merossomos (derivados da membrana da célula hospedeira), também evita os mecanismos de defesa do sistema imune (Zheng et al., 2014).

Os eritrócitos infectados expressam em sua superfície proteínas do parasito importantes para a adesão ao endotélio e, para escapar do reconhecimento pelos anticorpos que interferem na invasão e na citoaderência, o *Plasmodium* altera a expressão destas proteínas por um processo chamado de variação antigênica (Deroost et al., 2016), no qual os antígenos são encodados por diversas famílias multigênicas, garantindo assim a manutenção da infecção crônica (Yam & Preiser, 2017). Com essa capacidade de adesão ao endotélio, para evitar a destruição das células infectadas no baço, o *Plasmodium* desenvolveu a estratégia de sequestro celular dos parasitos em estágios mais maduros, trofozoítos e esquizontes, na microvasculatura de diferentes órgãos (Yam & Preiser, 2017). A formação de rosetas é um outro fenômeno que contribui para o escape do sistema imune, sendo mediada pela ligação de eritrócitos infectados aos receptores de superfície dos eritrócitos não infectados (Yam & Preiser, 2017). Sugere-se que este processo facilita a rápida invasão dos eritrócitos que ainda não foram infectados pelos merozoítos, favorecendo também a proteção dos parasitos recentemente liberados contra os anticorpos inibidores (Deroost et al., 2016).

2.7 Resposta imune gerada contra a infecção pelo *Plasmodium*

A primeira exposição ao parasito da malária certamente induz um quadro de doença no indivíduo, podendo ser grave e até mesmo levar à morte (Langhorne et al., 2008). Já adultos e jovens moradores de área endêmica estão constantemente expostos a repetidas infecções pelo *Plasmodium*, o que confere uma imunidade clínica que não impede a infecção pelo parasito, mas protege das complicações da doença (Langhorne et al., 2008; Moxon et al., 2020). Em contrapartida, aqueles que não apresentam sintomas, mesmo estando infectados, atuam como portadores assintomáticos e acabam contribuindo para a transmissão (Deroost et al., 2016). Nas áreas de baixo risco de malária, a imunidade é menos provável de ser desenvolvida, e até mesmo os adultos vivem sob o risco de evoluir para uma doença mais grave (Langhorne et al., 2008; Moxon et al., 2020).

A resposta eficiente contra a malária é aquela que consegue manter o delicado equilíbrio entre uma resposta imune capaz de controlar a infecção, sem causar danos ao hospedeiro (Moxon et al., 2020), e os mecanismos de evasão do parasito, que modulam ou contornam esta resposta imune (Deroost et al., 2016). A **Figura 5** ilustra muito bem os diferentes cenários que podem acontecer durante as tentativas de combate à infecção pelo *Plasmodium*.

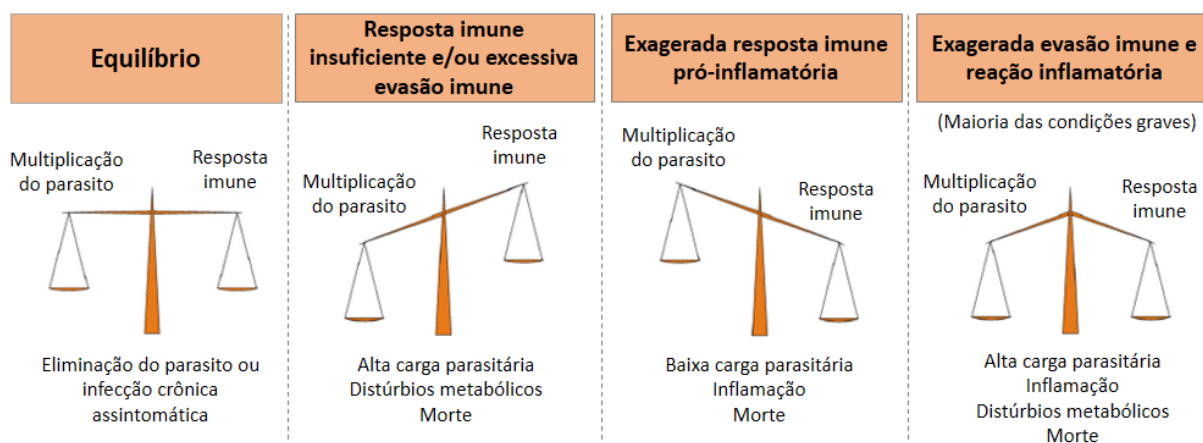


Figura 5 - Diferentes resultados que dependem do equilíbrio entre o crescimento do parasito e os mecanismos de controle imunológico. Fonte: Adaptado de Deroost et al. (2016).

O desequilíbrio devido a uma resposta imune exagerada, descontrole da multiplicação do parasito ou até mesmo uma combinação dos dois excessos, tem como consequência o desenvolvimento de uma patologia grave e até mesmo a

ocorrência de morte, o que não é viável para o hospedeiro nem para o parasito (Deroost et al., 2016). Os mecanismos de regulação da resposta imune, que evitam o excesso de inflamação, estão mais presentes nos pacientes assintomáticos ou com malária não complicada (Moxon et al., 2020).

2.7.1 Produção de citocinas durante a malária vivax e falciparum

Diversos produtos derivados do *Plasmodium* desencadeiam a produção de citocinas pró-inflamatórias via ativação de receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *toll-like receptors*). Para uma rápida eliminação do parasito, infecções por *P. falciparum* induzem uma produção inicial de fator de necrose tumoral-alfa (TNF α , do inglês *tumor necrosis factor alpha*), interferon-gama (IFN- γ), interleucina (IL)-1, IL-6, IL-12, entre outras citocinas e quimiocinas que podem causar disfunção endotelial e agravar o sequestro parasitário (R. M. Gonçalves et al., 2014). Com o controle da multiplicação dos parasitos, para reduzir a inflamação e o risco de uma doença grave, citocinas com função reguladora são necessárias, porém, a produção precoce de altos níveis de IL-10, por exemplo, pode prejudicar a eliminação do *P. falciparum* (R. M. Gonçalves et al., 2014).

Nas infecções sintomáticas por *P. vivax*, a resposta inicial pró-inflamatória parece ser mediada principalmente pelo IFN- γ , sendo observados altos níveis circulantes de outras citocinas como a IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-8, ligante indutor de proliferação (APRIL, do inglês *A Proliferation Inducing Ligand*), mas também de IL-10, que pode estar presente na tentativa de controlar a resposta inflamatória exacerbada (Antonelli et al., 2020). A concentração plasmática de IL-10 chega ser até 8 vezes maior na malária vivax quando comparada com a malária falciparum ou com aquelas causadas por infecções mistas (pelas duas espécies) (R. M. Gonçalves et al., 2014).

Estas características de respostas indicam que para lidar com as diferentes espécies de parasitos o hospedeiro desenvolveu diferentes estratégias. Para *P. falciparum*, a resposta predominantemente inflamatória é desencadeada na tentativa de conter a hiperparasitemia, porém, com risco de evoluir para quadros graves (R. M. Gonçalves et al., 2014). Já para *P. vivax*, a indução de uma forte resposta de IL-10 pode ser uma estratégia de maior custo-benefício para evitar danos teciduais e complicações clínicas, uma vez que esta espécie não confere risco de multiplicação exacerbada do parasito pelo fato de infectar apenas reticulócitos (R. M. Gonçalves et

al., 2012). Nos casos de coinfeção com as duas espécies, observa-se sintomas mais leves, redução do risco de malária grave, baixa recrudescência e densidade parasitária, sugerindo o possível papel do *P. vivax* em amenizar a gravidade das infecções causadas pelo *P. falciparum* (R. M. Gonçalves et al., 2014).

2.7.2 Resposta imune inata

Logo após a infecção, a resposta imune inata é ativada ao detectar parasitos tanto no estágio hepático quanto na fase sanguínea, desencadeando a produção de citocinas pró-inflamatórias, que induzem os fagócitos a capturar e eliminar os parasitos, como também de quimiocinas, que auxiliam o recrutamento das células efetoras nos locais parasitados (Gowda & Wu, 2018). Esta resposta ocorre devido ao reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*) pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *Pathogen-recognition receptors*), que também reconhecem padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês *Danger-associated molecular patterns*). Entre os principais PAMPs de *Plasmodium* identificados estão: Glicosilfosfatidilinositol (GPI), importante para ancorar várias proteínas dos merozoítos na superfície da membrana; hemozoína, um produto final produzido pelo parasito após a degradação da hemoglobina que evita a toxicidade do heme solúvel; ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*); e ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *deoxyribonucleic acid*) reconhecidos pelos seus motivos CpG (citosina-fosfato-guanina) não metilados e também quando complexados à hemozoína (Gazzinelli et al., 2014; Gowda & Wu, 2018). Já os DAMPs, envolvem principalmente: ácido úrico, um produto final de oxidação do metabolismo das purinas realizado pelos parasitos (Gowda & Wu, 2018) e o heme, que é liberado após a oxidação da hemoglobina livre (Gazzinelli et al., 2014). Esta primeira linha de defesa mediada pela imunidade inata atua tanto no controle da infecção pelo parasito quanto na regulação do desenvolvimento da imunidade adaptativa (Gowda & Wu, 2018).

2.7.2.1 Principais células da imunidade inata envolvidas

Os neutrófilos são capazes de fagocitar eritrócitos infectados como também os merozoítos, quando estes são opsonizados com anticorpos ou proteínas do sistema complemento, auxiliando na eliminação dos parasitos (Aitken et al., 2018). Ao produzir espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), o crescimento intraeritrocítico do parasito pode ser inibido. Um outro tipo de resposta antiparasitária, que ainda deve ser melhor elucidado, é a capacidade de liberação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*), desencadeada por algumas citocinas inflamatórias como também após o reconhecimento de cristais de ácido úrico, liberados pela ruptura dos eritrócitos infectados (Aitken et al., 2018). Durante a malária aguda, altos números de neutrófilos são observados no sangue periférico, contudo, estas células não parecem exercer um grande papel no controle da parasitemia e sua ativação pode estar associada ao dano tecidual (revisto por Antonelli et al., 2020), contribuindo com a patologia da malária grave (Aitken et al., 2018).

A fagocitose também é realizada pelos monócitos, macrófagos e células dendríticas. A remoção dos parasitos é realizada principalmente pelos macrófagos esplênicos, que são eficientes na remoção dos eritrócitos parasitados presentes na circulação, principalmente aqueles infectados por *P. falciparum* que não possuem flexibilidade suficiente para passar pelas fendas interendoteliais dos sinusoides (Deroost et al., 2016). O recrutamento em massa dos monócitos provenientes da medula óssea somado a sua proliferação local contribui para a hepatoesplenomegalia, muitas vezes observada durante a malária (Deroost et al., 2016). Quando infiltrados nestes tecidos, os monócitos se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas, aumentando a capacidade fagocítica e de apresentação de antígenos (Deroost et al., 2016). Estes macrófagos, assim como os monócitos, são os principais contribuintes para a tempestade de citocinas observada durante o paroxismo malárico (Gazzinelli et al., 2014).

Um tipo de linfócito conhecido como células exterminadoras naturais (NK, do inglês *natural killer*) também faz parte da imunidade inata, e nas infecções por *Plasmodium* produzem IFN- γ e controlam a parasitemia por serem capazes de eliminar os eritrócitos infectados (revisto por Antonelli et al., 2020). Linfócitos T do sistema imune inato também parecem ter papel no controle da infecção, como as

células NKT (que compartilham marcadores com as células T clássicas e com as células NK) e as células $T\gamma\delta$, sendo principalmente as do subtipo 2 que estão presentes no sangue periférico (revisto por Antonelli et al., 2020).

As células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígenos profissionais pois efetivamente capturam, processam e apresentam antígenos via complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) de classe I ou MHC de classe II, ativando células *naives* T CD8⁺ ou T CD4⁺, respectivamente. Assim, as células dendríticas agem como uma ponte entre a resposta imune inata com a resposta adaptativa do sistema imune (Osii et al., 2020). Durante a malária, é observada uma diminuição das células dendríticas no sangue, estando associada com uma resposta imune prejudicada (revisto por Antonelli et al., 2020) que não é capaz de induzir respostas efetivas das células T que auxiliam as células B, conseqüentemente reduzindo a produção de anticorpos que são necessários para o controle da infecção (Osii et al., 2020).

2.7.3 Resposta imune adaptativa mediada por células T CD8⁺

Os mecanismos da imunidade inata são importantes para o controle da parasitemia durante a fase aguda da doença mas, como não são capazes de eliminar a infecção, é fundamental a ativação da imunidade adaptativa (Deroost et al., 2016). As células T *naives* CD4⁺ e CD8⁺, após o desenvolvimento e maturação no timo, entram na circulação e se alojam nos órgãos linfoides secundários na espera da sinalização das células dendríticas para se tornarem ativadas (Osii et al., 2020). A apresentação de antígenos pelas células dendríticas via MHC de classe I promove a ativação das células T CD8⁺ *naive* após o reconhecimento pelo receptor de célula T (TCR, do inglês *T cell receptor*). Sinais coestimuladores, somados as citocinas produzidas pelas células dendríticas e/ou células T CD4⁺, auxiliam na diferenciação e expansão clonal. Assim, as células T CD8⁺ efetoras migram para a circulação em busca das células que expressam este antígeno cognato ligado ao MHC de classe I (Osii et al., 2020). As células alvo são eliminadas pela entrada de granzima B através dos poros formados pela liberação das perforinas, ambas produzidas pelas células T CD8⁺. Após a eliminação do patógeno, uma pequena parte das células T CD8⁺ se diferencia em células de memória, enquanto que a maior parte morre (Osii et al., 2020).

Na fase eritrocítica da infecção pelo *Plasmodium*, os linfócitos T CD8⁺ circulantes se encontram num estado altamente ativado, mas estas células têm mostrado um papel importante já na fase pré-eritrocítica ao eliminar os hepatócitos infectados após serem ativadas de uma maneira dependente do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *human leukocyte antigen*) classe I (revisto por Antonelli et al., 2020) (o MHC-I de humanos). Essa ativação das células T CD8⁺ também pode estar acontecendo via apresentação de antígenos dos esporozoítos pelas células dendríticas nos linfonodos drenantes da pele, após a inoculação dos parasitos pelo mosquito (Osii et al., 2020). Assim, as células T CD8⁺ ativadas migram para diferentes órgãos, incluindo o fígado, para realizar suas funções efetoras (Beeson et al., 2008). Como os eritrócitos não expressam HLA-I acabam não estando sujeitos à citotoxicidade mediada pelas células T CD8⁺, que é o caso das infecções pelo *P. falciparum*, nas quais é o IFN- γ produzido por estes linfócitos que auxilia na proteção. Já os reticulócitos, células preferencialmente infectadas pelo *P. vivax*, expressam HLA-I e são alvos das células T CD8⁺ circulantes, capazes de eliminar os reticulócitos infectados assim como os parasitos no seu interior (revisto por Antonelli et al., 2020). A medula óssea foi identificada como um importante reservatório de reticulócitos infectados pelo *P. vivax* (Obaldia et al., 2018), diante disso, a interação das células T CD8⁺ citotóxicas com os reticulócitos recentemente infectados pode estar acontecendo principalmente neste local (revisto por Antonelli et al., 2020). Outro papel das células T CD8⁺ pode estar associado a sua produção de granulicina, encontrada em altos níveis séricos de pacientes infectados por *P. vivax*, que possivelmente age como um fator solúvel na destruição dos reticulócitos infectados e também dos parasitos, colaborando com o controle da infecção (revisto por Antonelli et al., 2020).

2.7.4 Resposta imune adaptativa mediada por células T CD4⁺

A ativação das células T CD4⁺ auxiliares (Th, do inglês *T helper*) *naive* ocorre nos órgãos linfoides secundários, pelo reconhecimento via TCR de um antígeno cognato apresentado pelo HLA de classe II (MHC de classe II de humanos) da célula apresentadora de antígeno (Annunziato et al., 2015). Diversos fatores influenciam no processo de diferenciação das células T CD4⁺, como o tipo de célula apresentadora de antígeno, concentração do antígeno (duração e força do sinal), ligação de moléculas coestimuladoras, e também as citocinas locais produzidas (Annunziato et

al., 2015). Diante de todos estes fatores, a célula T CD4⁺ é polarizada para um dos diversos subgrupos que possuem funções diferentes, como as Th1, Th2, Th17, célula T folicular auxiliar (Tfh, do inglês *T follicular helper*), célula T reguladora (Treg), entre outras (Soon & Haque, 2018) (**Figura 6**). As células Th1 produtoras de IFN- γ estão associadas com a resposta contra patógenos intracelulares; as Th2 secretoras de IL-4, IL-5 e IL-13 respondem para helmintos; células Th17 que expressam IL-17 estão associadas com as infecções fúngicas e bacterianas; e as Tfh produtoras de IL-21 têm importante papel na resposta de anticorpos das células B (Walker & McKenzie, 2018).

As células T CD4⁺ são fundamentais na condução das respostas imunes inata e adaptativa durante a infecção pelo *Plasmodium*, e os diversos subgrupos celulares são identificados nos indivíduos com malária clínica (Kurup et al., 2019). Por diferentes maneiras, as células T CD4⁺ podem controlar a infecção: auxiliando os linfócitos T citotóxicos na fase hepática, conduzindo a produção de anticorpos no baço e medula óssea, e também como células de perfil Th1 produtoras de IFN- γ durante a fase eritrocítica (Soon & Haque, 2018). Contudo, o principal papel das células Th na proteção contra o estágio sanguíneo da malária está na sua habilidade em auxiliar as respostas de anticorpos (Antonelli et al., 2020).

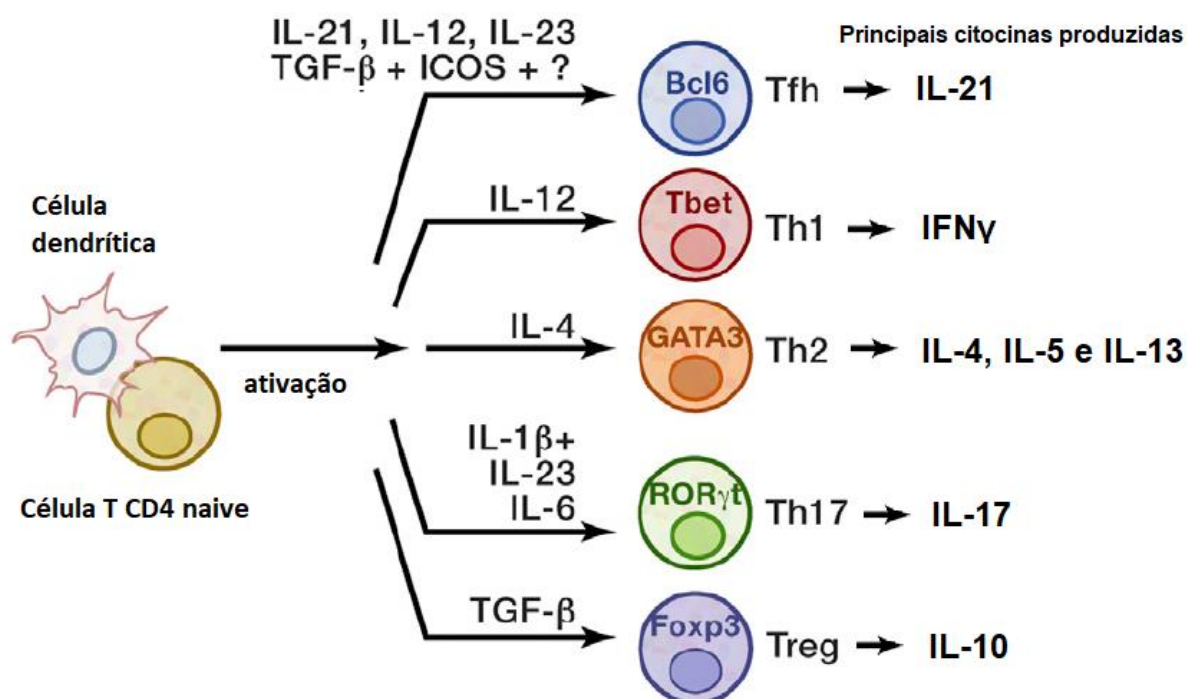


Figura 6 - Polarização da célula T CD4⁺. Fonte: Adaptado de Crotty (2014).

2.7.4.1 Células Th1

A diferenciação das células T CD4⁺ *naive* em células Th1 é mediada principalmente pela produção de IL-12 pelas células dendríticas (**Figura 6**), podendo ter sua atividade potencializada por outras citocinas como a IL-18, produzida por várias células; IFN- γ , produzida pelas células NK; e IFN- α , produzida pelas células dendríticas plasmocitoides (Annunziato et al., 2015). Além disso, a interação entre moléculas coestimuladoras como o CD40, expresso pelas células dendríticas ou macrófagos, e o CD40 ligante (CD40L ou CD154), presente no linfócito, induz uma maior produção de IL-12 (Annunziato et al., 2015). As células Th1 são caracterizadas pela sua produção de IFN- γ , expressão do fator de transcrição T-bet (TBX21) (**Figura 6**), como também dos receptores de quimiocinas CXCR3 e CCR5, que permitem seu recrutamento para os locais de inflamação (Annunziato et al., 2015). Estas células podem potencializar a ação citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ e das células NK mas, além do seu papel protetor, elas podem ser responsáveis por distúrbios inflamatórios crônicos (Annunziato et al., 2015).

As células Th1, assim como altos níveis de IFN- γ , são detectados tanto na malária humana quanto na malária murina experimental (Kurup et al., 2019). Um estudo mostrou que as células dendríticas humanas, após serem ativadas pelo *P. falciparum*, apresentam uma resposta incomum, que apesar da ausência da produção das citocinas típicas inflamatórias, mas com alta expressão das moléculas coestimuladoras e quimiocinas, podem ser capazes de induzir exclusivamente a diferenciação das células T CD4⁺ para o perfil Th1 (Götz et al., 2017). Os mecanismos pelos quais as células Th1 e IFN- γ contribuem para a proteção contra a infecção pelo *Plasmodium* ainda não estão bem elucidados (Kurup et al., 2019). De acordo com alguns estudos realizados em camundongos deficientes de T-bet ou de IL-12, foi observada uma redução da produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ e um descontrole da infecção pelo parasito (Kurup et al., 2019). Na infecção por *P. falciparum*, a produção de IL-2 por estas células também auxilia na ativação das células NK, que colaboram no controle da infecção no estágio sanguíneo (Horowitz et al., 2010). Além do seu papel na infecção natural, as células Th1 podem contribuir para a eficácia da atual vacina Mosquirix (Soon & Haque, 2018), elaborada contra a infecção pelo *P. falciparum*.

2.7.4.2 Células Th2

As células T CD4⁺ são polarizadas para o tipo Th2 pelos sinais instrutores da citocina IL-4, que induz a expressão do fator de transcrição GATA3, muito característico deste tipo celular, assim como a produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Walker & McKenzie, 2018) (**Figura 6**). As células Th2 são capazes de ativar mastócitos, basófilos e eosinófilos (Sallusto et al., 2018), e estão envolvidas em respostas protetoras contra infecções por helmintos e no reparo de dano tecidual, porém, suas citocinas também colaboram com as alergias e asma (Walker & McKenzie, 2018). Nas infecções por *Plasmodium*, as células T CD4⁺ GATA3⁺ são raras e, devido à forte polarização para o tipo Th1, a diferenciação em Th2 pode ser limitada, e com isso, o papel das células Th2 durante a malária permanece relativamente desconhecido (Kurup et al., 2019). A contribuição da IL-4 para as respostas contra o *Plasmodium* pode estar associada à troca de classe dos anticorpos produzidos pelas células B, na modulação das repostas dos macrófagos e no aumento da resposta humoral em indivíduos expostos ao parasito (Kurup et al., 2019). No estágio hepático, a IL-4 derivada de célula T CD4⁺ demonstra sua importância ao promover a resposta de células T CD8⁺ e manter a função das células de memória específicas para o *Plasmodium* (Kurup et al., 2019).

2.7.4.3 Células Th17

As células Th17 expressam o fator de transcrição RORC (equivalente ao murino ROR γ t), receptor da IL-23 (IL-23R), e os receptores de quimiocina CCR4 e CCR6 (Annunziato et al., 2015). Elas se diferenciam na presença de IL-1 β (ou IL-6) e IL-23, não requerendo o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , do inglês *transforming growth factor beta*) (Annunziato et al., 2015), e receberam este nome pois a principal citocina produzida por estas células é a IL-17 (Romagnani et al., 2009) (**Figura 6**). O TGF- β não tem um efeito direto na diferenciação das células Th17, mas favorece a sua expansão por inibir o desenvolvimento das células Th1 (Romagnani et al., 2009). Em comparação com as células Th1 e Th2, as Th17 são raramente encontradas nos locais de inflamação, que pode ser devido à autorregulação que limita sua expansão, como também pela sua plasticidade em mudar para um fenótipo

Th1 produtor de IFN- γ (Annunziato et al., 2015). As células Th17 sofrem essa conversão para Th1 sob influência de IL-12, TNF α e/ou IL-1 β , e passam a expressar os dois fatores de transcrição, T-bet e RORC (Sallusto et al., 2018), sendo caracterizadas fenotipicamente como CCR6⁺CXCR3⁺ (Sandquist & Kolls, 2018), e conhecidas como células Th1 não clássicas ou Th17/Th1 (Annunziato et al., 2015).

Devido à produção de citocinas da família IL-17, como também a IL-22 e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), as células Th17 colaboram com a progressão de muitas doenças autoimunes e inflamatórias (Sandquist & Kolls, 2018). Nas infecções por bactérias e fungos, estas células estão envolvidas no recrutamento de neutrófilos e produção de peptídeos antimicrobianos (Sallusto et al., 2018). Com relação à malária, poucos estudos têm descrito a presença das células Th17 durante a infecção pelo *Plasmodium*, e a resposta de neutrófilos neste caso mostrou ter um efeito patológico associado com a doença grave (Kurup et al., 2019). São poucas as evidências de que a IL-17 produzida pelas células Th17 possui algum papel no controle da infecção pelo *Plasmodium* (Soon & Haque, 2018). Um estudo envolvendo indivíduos com malária falciparum mostrou que a coinfeção com filária diminui as frequências de células Th1 e Th17 específicas para *Plasmodium* (Metenou et al., 2011). Em animais, foram identificados números muito baixos de células Th17 no baço dos camundongos infectados com *Plasmodium*, no entanto, como estas células também são capazes de produzir IL-21, quando presentes no baço podem desempenhar algum papel na geração dos centros germinativos (Kurup et al., 2019).

2.7.4.4 Células Tfh

A diferenciação das células T CD4⁺ *naive* para Tfh depende de um processo de vários estágios, que começa na interação com a célula dendrítica e depois com a célula B pelo reconhecimento do antígeno via TCR (Crotty, 2014). A diferenciação destas células é modulada na presença de IL-6, coestimulador induzível (ICOS, do inglês *inducible costimulator*), IL-2 (Crotty, 2014), IL-21, IL-12, IFN do tipo 1 e IFN- γ (Hansen et al., 2017). A sinalização inicial pela IL-6 induz a expressão do fator de transcrição Bcl-6 (do inglês *B cell lymphoma 6*) e conseqüentemente do receptor de quimiocina CXCR5, e assim, esta célula Tfh inicial migra para a borda do folículo de células B onde passa pela outra fase de diferenciação após a interação com as células

B antígeno-específicas, que servirão como células apresentadoras de antígeno e como fonte de ICOS ligante (ICOSL). Células Tfh que expressam a proteína de morte celular programada (PD-1, do inglês *programmed death-1*) são mais polarizadas e altamente funcionais em relação às aquelas negativas para PD-1 (Crotty, 2014).

Com a expressão de uma combinação de moléculas efetoras somada a produção de IL-21, as células Tfh são especializadas em auxiliar as células B (Hansen et al., 2017) que, após serem ativadas pelas células apresentadoras de antígenos, necessitam dessa ajuda das células Tfh cognatas para a maturação da afinidade e troca de classe de anticorpo (Yap et al., 2019). Portanto, o principal papel das células Tfh está relacionado ao desenvolvimento dos centros germinativos e de suas funções, onde auxiliam na geração e seleção de células B com alta afinidade para o patógeno, como também no fornecimento dos sinais essenciais via CD40L, IL-21 e IL-4 para a sobrevivência e proliferação destas células (Crotty, 2014). As células Tfh são fundamentais tanto para a ativação das células B *naive* durante a infecção primária, quanto para a reativação das células B de memória nas infecções secundárias (Yap et al., 2019). A adequada regulação da ação das células Tfh voltada para as células B de alta ou baixa afinidade é o que vai determinar as respostas no centro germinativo (Crotty, 2014).

As células Tfh presentes no sangue humano parecem representar as células Tfh de memória dos centros germinativos, e ainda podem ser subdivididas de acordo com a expressão de CXCR3 e CCR6 em Th1 (CXCR3⁺CCR6⁻), Th2 (CXCR3⁻CCR6⁻) e Th17 (CXCR3⁻CCR6⁺), com cada subgrupo possuindo capacidade diferente em regular as respostas de células B (Morita et al., 2011). As células Tfh-Th1 mostraram ser incapazes de auxiliar as células B, por outro lado, as células Tfh-Th2 e Th17 produtoras de IL-21 induziram a produção de imunoglobulinas (Igs) pelas células B *naive*; enquanto as Tfh-Th2 promoveram a secreção de IgG e IgE, as Tfh-Th17 induziram IgG e IgA (Morita et al., 2011).

Estudos sobre o papel das células Tfh humanas na infecção por *Plasmodium* são raros, sendo a maioria realizados em modelos animais. As infecções murinas com linhagens não letais de *Plasmodium* (*P. yoelii* e *P. chabaudi*) mostram que as células Tfh estão associadas com o controle da multiplicação do parasito, sendo fundamentais para a produção de anticorpos, tendo a IL-21 como uma citocina chave neste processo (Hansen et al., 2017). Por outro lado, a infecção murina por *P. berghei* ANKA, que induz uma forte resposta inflamatória e contribui para a patogênese, mostrou uma

prejudicada geração dos centros germinativos no baço e um comprometimento na diferenciação das células Tfh (Ryg-Cornejo et al., 2016). Foi observado um aumento da expressão de T-bet nestas células, e conseqüentemente de CXCR3, e após a deleção gênica de T-bet ou o bloqueio das citocinas TNF e IFN- γ , foi restaurada a diferenciação das células Tfh assim como a resposta no centro germinativo frente à infecção (Ryg-Cornejo et al., 2016).

Durante a malária, sugere-se que a excessiva polarização para uma resposta Th1 produtora de IFN- γ tenha influência na redução da longevidade da resposta de anticorpos (Yap et al., 2019). Um estudo realizado com amostras de crianças da África com malária falciparum mostrou que as células Tfh de perfil Th1 é o subgrupo preferencialmente ativado durante a infecção, e que justamente estas células não são capazes de auxiliar as células B de maneira eficiente (Obeng-Adjei et al., 2015). No caso da infecção pelo *P. vivax* em adultos brasileiros, outro grupo mostrou que durante a fase aguda da doença ocorre um aumento da frequência de células Tfh na circulação, que se correlaciona com o número de episódios de malária (Figueiredo et al., 2017). A infecção pelo *P. vivax* desencadeou a produção de IL-21, e nos ensaios de cultura, as células Tfh mostraram ser capazes de induzir a produção de Igs pelas células B *naive* (Figueiredo et al., 2017). Além disso, também foi observado um aumento na frequência das células Tfh de perfil Th1, como também as de perfil Th17 durante a malária aguda (Figueiredo et al., 2017).

A avaliação das células Tfh e seu perfil de ativação foi realizada durante um estudo sobre a eficácia de diferentes estratégias vacinais contra *P. falciparum*, num grupo de voluntários submetidos à infecção controlada (Bowyer et al., 2018). A estratégia de se coadministrar duas plataformas diferentes da vacina mostrou redução da imunogenicidade, com forte resposta de citocinas Th1 associadas à indução de células Tfh CXCR3⁺ (perfil Th1) e redução na quantidade e qualidade dos anticorpos específicos para o parasito (Bowyer et al., 2018). Com base nas informações sobre a contribuição das células Tfh na infecção pelo *Plasmodium*, estratégias vacinais que induzam a resposta para um perfil que não seja Th1 poderiam melhorar a eficácia de uma futura vacina (Obeng-Adjei et al., 2015). A **Figura 7** mostra um esquema sobre o possível papel das células Tfh durante a malária.

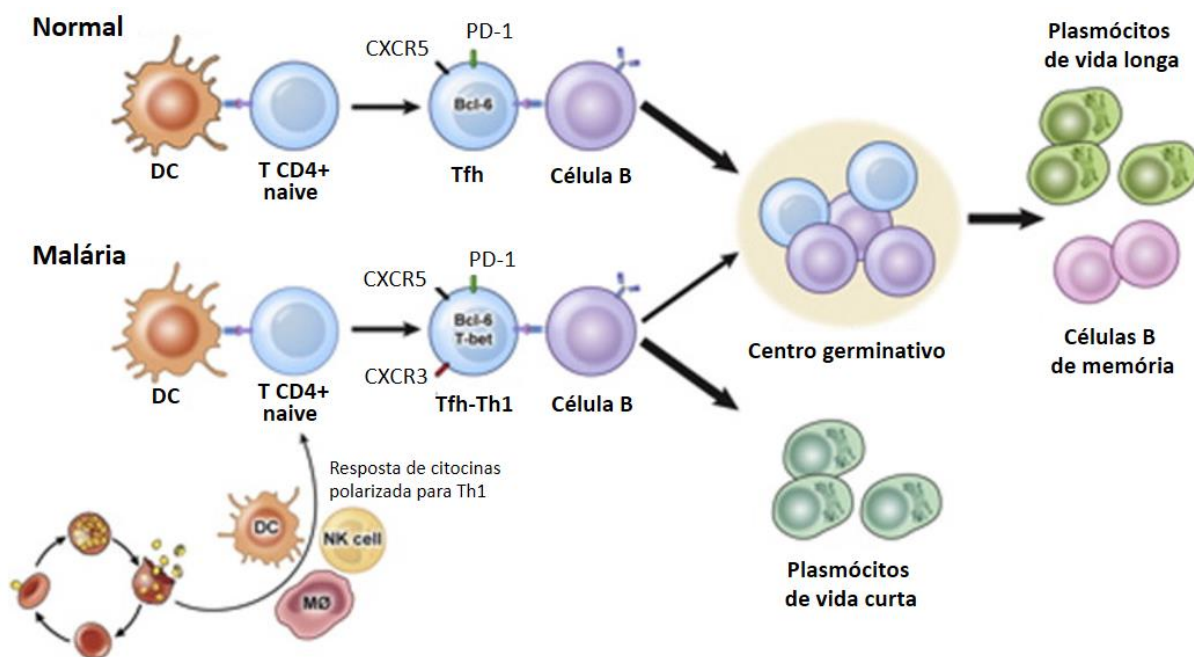


Figura 7 - Papel das células Tfh de perfil Th1 induzidas pela infecção pelo *Plasmodium* na ineficiente aquisição de imunidade humoral contra a malária. DC, célula dendrítica. Fonte: Adaptado de Hansen et al. (2017).

A geração de respostas de citocinas Th1 devido à infecção pelo *Plasmodium* induz a ativação de células Tfh com perfil Th1 que não auxiliam de maneira eficaz as células B (Hansen et al., 2017). Assim, a formação dos centros germinativos acaba sendo prejudicada, contribuindo para a aquisição de uma imunidade humoral ineficiente, que pode estar sendo mais direcionada para a geração de plasmócitos de vida curta do que para os de vida longa, além da diminuição da geração de células B de memória (**Figura 7**) (Hansen et al., 2017). Mais estudos são necessários sobre o direto impacto das células Tfh de perfil Th1 na diferenciação das células B e nas suas funções durante a infecção pelo *Plasmodium* (Hansen et al., 2017).

2.7.4.5 Células Treg

Embora as células Treg compreendam somente 3 a 5% das células T presentes no sangue periférico (Richards et al., 2015), elas possuem ampla funcionalidade que abrange: tolerância a autoantígenos, aos antígenos da microflora comensal e alimentares; capacidade de limitar o excesso de resposta imune; regulação da imunidade fetoplacentária; e papel na homeostase e regeneração tecidual (Shevyrev & Tereshchenko, 2020). É no timo onde a maioria das células Treg maduras são

produzidas (chamadas tTreg), mas elas também podem ser geradas na periferia (pTreg) a partir do encontro das células T CD4⁺ *naive* com seu antígeno cognato, passando a expressar o fator de transcrição FoxP3 (Richards et al., 2015). A IL-2 e seu receptor CD25 (IL-2R α) são essenciais para o desenvolvimento e manutenção das células Treg (Shevyrev & Tereshchenko, 2020), assim como a citocina TGF- β que parece ser mais importante na conversão destas células na periferia (Richards et al., 2015). O repertório de TCR da célula tTreg é voltado para autorreconhecimento, e os expressos nas pTregs podem reconhecer antígenos estranhos com alta afinidade (Shevyrev & Tereshchenko, 2020). Com a descoberta dos principais marcadores das células Treg, seu fenótipo ficou definido como CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺, porém, como a marcação de FoxP3 é intracelular, para os ensaios funcionais utiliza-se o fenótipo CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low}, pois foi observado uma baixa expressão do receptor da IL-7 (CD127) nestas células (Shevyrev & Tereshchenko, 2020). Marcadores humanos específicos para tTreg e pTreg ainda permanecem desconhecidos (Shevyrev & Tereshchenko, 2020).

De acordo com sua diferenciação, as células Treg são subdivididas em *naive*, memória central, memória efetora e efetora. As moléculas CCR7 e CD62L são as que mantêm as Treg nos órgãos linfoides secundários, e a expressão de CD152 (CTLA-4, do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) é a que confere sua capacidade supressora (Shevyrev & Tereshchenko, 2020). A afinidade do seu TCR determina diferentes mecanismos funcionais de supressão, mas todos mantendo a capacidade de dar suporte tanto a autotolerância quanto para o equilíbrio imune (Shevyrev & Tereshchenko, 2020). As células Treg com baixa afinidade acabam ativando mecanismos de supressão não dependentes de TCR, expressando mais Ebi3, responsável pela supressão via IL-35, enquanto as células com alta afinidade expressam IL-10, TIGIT, GITR e CTLA-4, que são mediadores dependentes da sinalização via TCR (Shevyrev & Tereshchenko, 2020). O TNF- α é uma citocina inflamatória que pode ter efeito imunossupressor, pois ao se ligar no seu receptor II do fator de necrose tumoral (TNFR2, do inglês *tumor necrosis factor receptor II*), predominantemente expresso pelas células Treg, acaba ativando e aumentando a atividade supressora destas células (Xin Chen & Oppenheim, 2010).

Diante do fato de que as respostas imunes devem ser muito bem reguladas para um efetivo controle do patógeno com mínimo dano ao hospedeiro, buscas foram feitas na tentativa de entender se as células Treg eram importantes na fase eritrocítica

da infecção pelo *Plasmodium* (Soon & Haque, 2018). A excessiva resposta pró-inflamatória está associada à patogênese da malária aguda, e mecanismos imunorreguladores são necessários para a prevenção dos danos, porém, quando superativados, podem comprometer o controle da infecção (Antonelli et al., 2020). Estudos observaram que o aumento na frequência de células Treg circulantes está correlacionado com o nível da parasitemia nas infecções por *P. vivax* e por *P. falciparum* (Bueno et al., 2010; R. M. Gonçalves et al., 2010; Walther et al., 2005), mas principalmente nos casos de malária falciparum grave, que além das células Treg apresentarem alta expressão de TNFR2, elevados níveis séricos deste receptor na forma solúvel também estavam presentes (Minigo et al., 2009). A infecção tanto por *P. vivax* (Bueno et al., 2010; Costa et al., 2018) quanto por *P. falciparum* induziu a expansão de células Treg que expressam as moléculas imunomoduladoras CTLA-4 (Gonçalves-Lopes et al., 2016; R. M. Gonçalves et al., 2010) e GITR, assim como de células Treg produtoras de citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e TGF- β , e pró-inflamatórias, IFN- γ e IL-17 (Bueno et al., 2010). A capacidade de supressão da proliferação de células T específicas para *P. vivax* também foi demonstrada pelas células Treg dos indivíduos infectados (Bueno et al., 2010).

Na infecção por *P. vivax*, foi observada uma prejudicada maturação das células dendríticas circulantes, com baixos níveis de expressão da molécula coestimuladora CD86 nos indivíduos com menores frequências de células Treg CTLA-4⁺ (R. M. Gonçalves et al., 2010). Como a interação entre CTLA-4 da célula Treg e CD86, presente nas células dendríticas, pode resultar na expansão de células Treg de acordo com as citocinas presentes, os autores acreditam que em alguns indivíduos com malária vivax a falta deste estímulo de CD86 pode levar à redução das proporções de células Treg CTLA-4⁺ (R. M. Gonçalves et al., 2010). Nos casos de pacientes assintomáticos, mas infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum*, foi observado um aumento das células dendríticas circulantes com uma diminuição de células Treg ativadas, demonstrando que o controle da infecção está associado com a presença de células dendríticas funcionais capazes de reduzir a ativação das células Treg, que podem estar prejudicando o desenvolvimento da imunidade protetora contra a malária (Kho et al., 2015).

2.7.4.6 Células Tfr

Fazendo parte de um subgrupo das células Treg, as células T foliculares reguladoras (Tfr) são especializadas em controlar as reações nos centros germinativos ao suprimir tanto as respostas das células B quanto das Tfh (Sage & Sharpe, 2016). Assim como as células Tfh, as Tfr expressam altos níveis de CXCR5, para direcioná-las aos centros germinativos, PD-1, ICOS e o fator de transcrição Bcl-6, mas também expressam CD25, FoxP3 e Blimp-1 (Maceiras et al., 2017; Sage & Sharpe, 2016), sendo este último identificado apenas em camundongos (Maceiras et al., 2017). A diferenciação das células Tfr ocorre nos órgãos linfoides secundários em resposta ao antígeno apresentado pelas células dendríticas, e somente após a interação com a célula B cognata no centro germinativo é quando se torna totalmente diferenciada; muito similar ao processo das células Tfh (Sage & Sharpe, 2016). Aquelas presentes na circulação são originadas a partir da interação inicial com as células dendríticas, saindo dos órgãos linfoides secundários antes do contato com as células B (Maceiras et al., 2017). Sinais coestimuladores via CD28 e ICOS, presentes nas células Tfr, pela ligação ao CD80/CD86 e ICOSL, presentes nas células B e em células dendríticas, são essenciais para sua diferenciação e/ou expansão (Sage & Sharpe, 2016).

A citocina IL-21, produzida principalmente pelas células Tfh, tem um impacto negativo na proliferação das Tfr (Maceiras et al., 2017). PD-1 pode inibir sua função supressora bem como a diferenciação. Já o receptor inibitório CTLA-4, muito expresso pelas células Treg e mais ainda pelas células Tfr, tem um importante papel na supressão das respostas de anticorpo e proliferação das células B, como também no controle da ativação das células Tfh (Sage & Sharpe, 2016). Outros mecanismos reguladores podem estar associados com a capacidade supressora das células Tfr, como a secreção de IL-10 e TGF- β , indução de morte celular pela secreção de granzima B, e interferência no contato da célula Tfh com a célula B no centro germinativo (Maceiras et al., 2017). Entretanto, com relação à IL-10, sua produção pelas células Tfr pode não representar um mecanismo de regulação, pois esta citocina é importante para a sobrevivência e proliferação das células B no centro germinativo, ao contrário do TGF- β , que mostra ser importante para a supressão das células Tfh (Maceiras et al., 2017).

A descrição das células Tfr têm sido realizada tanto em camundongos quanto em humanos mas, pela dificuldade em se obter amostras de tecidos linfoides humanos, as investigações destas populações são realizadas a partir do sangue, considerando como células Tfr circulantes aquelas com o fenótipo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CXCR5⁺ (Maceiras et al., 2017). Na síndrome de Sjögren, uma doença autoimune, um estudo mostrou aumento na frequência de células Tfr circulantes, principalmente nos pacientes com altos títulos de autoanticorpos, capazes de suprimir a proliferação de células T, mas sem a habilidade de supressão das células B (Fonseca et al., 2017). Ao comparar com as Tfr obtidas das tonsilas, foi observado que as Tfr circulantes expressam baixos níveis de ICOS, PD-1 e Bcl-6 (Dhaeze et al., 2015; Fonseca et al., 2017), e que a incompleta função supressora provavelmente ocorre pela saída dessas células dos tecidos linfoides ainda imaturas (Fonseca et al., 2017). Assim, não se diferenciam totalmente pela falta de interação com as células B na borda do folículo; um dado que foi suportado pela presença de células Tfr no sangue de pacientes que não possuem células B devido a uma deficiência genética (Fonseca et al., 2017). Os autores sugerem que as células Tfr circulantes são um indicativo de atividade humoral e que não são uma medida do potencial supressor da resposta imune (Fonseca et al., 2017). No caso da esclerose múltipla, uma outra doença autoimune, as células Tfr estão reduzidas na circulação periférica e com menor capacidade supressora (Dhaeze et al., 2015). De acordo com isso, nem todos os estudos sobre as células Tfr na autoimunidade são concordantes (Maceiras et al., 2017).

Na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), indivíduos com anticorpos amplamente neutralizantes não possuem alteração na frequência de células Tfr, porém, o aumento da expressão de PD-1 nestas células foi observado (Moody et al., 2016). Nas infecções crônicas pelos vírus da hepatite B (HBV) e C (HCV), um aumento dos números de células Tfr circulantes foi encontrado, com significativa correlação com a carga viral e dano hepático nos pacientes (Wang et al., 2014). Elevada frequência de células Tfr no sangue também foi encontrada em pacientes com esquistossomose (X. Chen et al., 2015). Um exemplo do impacto de uma imunodeficiência primária nas células Tfr é o caso de pacientes com perda de função do receptor da IL-21 devido a mutações. Esta deficiência induz o aumento da expansão das células Tfr que foram detectadas no sangue destes indivíduos (Jandl et al., 2017). Observações destas células após a vacina contra influenza mostraram

também esse aumento na frequência (Fonseca et al., 2017), que se correlacionou com a resposta de anticorpos específicos para o vírus (Dhaeze et al., 2015). Este cenário reforça a ideia de que as células Tfr são geradas durante as respostas nos centros germinativos, e que algumas delas saem destes tecidos para a circulação periférica (Fonseca et al., 2017).

Assim, as células Tfr têm sido estudadas em diversas doenças autoimunes, infecções virais, por helmintos e imunodeficiências primárias (Maceiras et al., 2017) mas, nas infecções humanas pelo *Plasmodium*, ainda não encontramos trabalhos envolvendo estas células.

2.7.4.7 Outras células Th que podem auxiliar na resposta contra a malária

A IL-22 é uma citocina que também pode ser produzida pelas células Th17, Th22 e $T\gamma\delta$, e foi detectada em altos níveis nos pacientes infectados por *P. falciparum*, mostrando também contribuir para a proteção nos modelos de infecção utilizando camundongos (Soon & Haque, 2018). Durante a fase sanguínea da infecção, a IL-22 possivelmente está associada na prevenção de danos em órgãos, e futuros estudos podem ajudar no melhor entendimento do papel das células Th22 na imunossupressão durante a malária (Soon & Haque, 2018).

Um novo subgrupo de células Th produtoras de IL-27 e com capacidade reguladora foi descrito, sendo nomeado Tr27, e o interessante é que esta citocina mostrou estar associada à proteção contra a patologia desencadeada pela infecção por *Plasmodium* (Soon & Haque, 2018). Se as células Tr27 são geradas durante a malária e se podem conferir proteção contra a patologia causada pela resposta imune, é uma questão que ainda deve ser elucidada (Soon & Haque, 2018).

2.7.5 Resposta imune mediada por anticorpos

O encontro da célula B *naïve* com seu antígeno específico, num contexto extrafolicular sem o auxílio das células T, induz a proliferação e diferenciação em plasmócitos de vida curta produtores de anticorpos muito importantes no controle da infecção, mas que acabam sofrendo apoptose depois de alguns dias ou semanas (Deroost et al., 2016). Já nos centros germinativos, os linfócitos T CD4⁺ podem dar

suporte aos linfócitos B para a diferenciação em plasmócitos de vida longa e células B de memória com alta afinidade, que produzirão anticorpos específicos anti-*Plasmodium* (Deroost et al., 2016). Os anticorpos têm como principais alvos os antígenos de superfície dos merozoítos, ligantes para a invasão dos eritrócitos, e as variantes de antígenos de superfície expressas pelos eritrócitos infectados (Beeson et al., 2008). Com essa capacidade de reconhecimento, os anticorpos são eficientes no bloqueio da invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, na morte celular dependente de anticorpo, e na ligação aos antígenos expressos pelo parasito na superfície dos eritrócitos infectados, induzindo a eliminação destas células (Langhorne et al., 2008). A opsonização dos merozoítos pelos anticorpos também ativa a via clássica do complemento que desencadeia a lise dos parasitos, um mecanismo de bloqueio da reinvasão que parece ser o mais eficiente (Deroost et al., 2016). O grande papel dos anticorpos ficou muito evidente nos estudos de transferência passiva de IgG de pessoas semi-ímmunes, que mostraram eficácia na diminuição da parasitemia assim como dos sintomas (Deroost et al., 2016). A resposta pró-inflamatória do tipo Th1 estimula a troca do isotipo para citofílico ou opsonizante, tais como IgG1 e IgG3, que são os mais importantes para o controle da infecção (Deroost et al., 2016).

A infecção pelo *Plasmodium* induz a produção de anticorpos contra diversos antígenos presentes nas diferentes formas do parasito, sendo uma resposta voltada principalmente para os antígenos do estágio sanguíneo (Silveira et al., 2018). Anticorpos anti-esporozoítos podem ser detectados, porém, é mais frequente em indivíduos com mais de 50 anos de idade, sendo raro em crianças (Long & Zavala, 2017). Entre os antígenos presentes nos esporozoítos e reconhecidos pelos anticorpos, está a proteína circunsporozoíta (CSP), que foi o primeiro antígeno identificado presente neste estágio (Long & Zavala, 2017). O domínio de repetição desta proteína, muito conservado nas linhagens de *P. falciparum*, é a região de maior reconhecimento pelos anticorpos (Long & Zavala, 2017). Contudo, a imunidade adquirida naturalmente pelos indivíduos expostos parece ser mediada principalmente por anticorpos específicos para os estágios sanguíneos e não para os esporozoítos. A resposta de anticorpos para a CSP, quando comparada aos antígenos das formas sanguíneas, tende a ser menos intensa e de vida mais curta (revisado por Antonelli et al., 2020).

Proteínas de merozoítos envolvidas na invasão dos eritrócitos também são alvos de anticorpos detectados no soro de indivíduos infectados, como a proteína 1

de superfície do merozoíto (MSP1, do inglês *merozoite surface protein 1*) e o antígeno 1 de membrana apical (AMA1, do inglês *apical membrane antigen 1*), presentes tanto em *P. falciparum* como em *P. vivax*, assim como o antígeno 175 de ligação ao eritrócito (EBA-175, do inglês *erythrocyte-binding antigen-175*) do *P. falciparum* (Deroost et al., 2016). Anticorpos com capacidade de inibição da invasão, que se correlacionam com a proteção contra infecções por *P. falciparum* e *P. vivax*, reconhecem, respectivamente, a proteína homóloga 4 de ligação ao reticulócito (PfRh4, do inglês *reticulocyte-binding-homologue-4*) e a proteína de ligação ao antígeno Duffy (DBP, do inglês *Duffy binding protein*) (Deroost et al., 2016). Mais detalhes sobre as principais proteínas do *P. vivax*, AMA1, DBP e MSP1, serão abordados adiante.

O reconhecimento de antígenos do *Plasmodium* pode acontecer por reatividade cruzada das respostas de células B geradas por outras infecções, como no caso daquelas ocorridas por *Schistosoma mansoni*, no qual foi identificado similaridade com alguns antígenos do *P. falciparum* (Naus et al., 2003; Pierrot et al., 2006). Além disso, amostras de soro de pacientes com lúpus sistêmico eritematoso e outras doenças autoimunes, também mostraram possuir anticorpos com capacidade de reconhecer antígenos do parasito (Brahimi et al., 2011; Zanini et al., 2009).

2.7.6 Células B e suas subpopulações

Uma resposta imune humoral potente é caracterizada pela geração de plasmócitos de vida longa juntamente com as células B de memória nos centros germinativos (Yap et al., 2019), onde ocorre a seleção de clones de células B com alta afinidade para o antígeno (Deroost et al., 2016). Para isso, primeiramente é necessário a ativação das células B, mediada principalmente pelas células dendríticas, seguido pela interação com as células T cognatas, permitindo assim, a sua proliferação, maturação da afinidade e troca de classe (Yap et al., 2019). As citocinas IL-21, IL-6 e o fator ativador de células B (BAFF, do inglês *B cell activating factor*), juntamente com as moléculas coestimuladoras CD40L e ICOS, possuem papel chave na manutenção dos centros germinativos, onde as células B sofrem vários processos de seleção antigênica, hipermutações somáticas e troca de classe de Ig para adquirir seu estágio maduro (Silveira et al., 2018). De acordo com a sinalização nos passos finais da ativação, as células B saem dos folículos e se diferenciam em

células B atípicas, células B de memória ou em plasmócitos produtores de anticorpos; estes que migram para a medula óssea ou para órgãos linfoides secundários, quando caem na circulação (Silveira et al., 2018), secretando constantemente baixos níveis de anticorpos para formar a primeira linha de defesa no caso de uma próxima infecção (Deroost et al., 2016). As células T fundamentais para realizar este papel são as células Tfh, que se localizam com as células B nos centros germinativos, sendo essenciais tanto para a ativação das células B *naive* durante a infecção primária quanto para a reativação de células B de memória nas infecções secundárias (Yap et al., 2019).

Sobre a longevidade da resposta imune humoral desenvolvida durante a malária, muitos estudos mostraram que após a cura da infecção ocorre um rápido declínio desta resposta (revisto por Antonelli et al., 2020). A geração de subgrupos de células B importantes para a resposta humoral pode ser afetada pela infecção pelo *Plasmodium* (Silveira et al., 2018). Nas regiões de alta exposição ao *P. falciparum*, foi observada uma expansão e acúmulo de células B de memória atípica, que podem estar contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta imune humoral de vida curta (Portugal et al., 2015; Weiss et al., 2009). Estas células expressam uma série de receptores inibitórios e possuem sinalização prejudicada via receptor de célula B (BCR, do inglês *B-cell receptor*), que afetam sua proliferação, produção de citocinas e diferenciação em células secretoras de anticorpos (Portugal et al., 2015). Um estudo mostrou que as células B de memória atípica apresentam alta expressão de T-bet, que se correlaciona negativamente com a sinalização do BCR. Além disso, viram que as células Tfh de perfil Th1 induziram eficientemente essa expressão de T-bet nas células B *naive*, e que o IFN- γ é uma citocina importante para este processo (Obeng-Adjei et al., 2017). Na infecção por *P. vivax*, também foi observado um aumento na frequência de células B de memória atípica (CD19⁺CD21⁻CD27⁻) assim como de células B de memória ativada (CD19⁺CD21⁻CD27⁺), estando a fase de convalescença associada com um aumento de memória clássica (CD19⁺CD21⁺CD27⁺) e de células B *naive* (CD19⁺CD21⁺CD27⁻) (Figueiredo et al., 2017). A exposição frequente ao *Plasmodium* parece ser um fator determinante para o desenvolvimento das células B de memória atípica, que podem representar uma desregulação da resposta imune humoral desenvolvida durante a malária (Yap et al., 2019).

2.8 Células B reguladoras

O controle do excesso de inflamação desencadeado pelo sistema imune também pode ser realizado por células B com capacidade supressora, conhecidas como células B reguladoras (Breg) (Rosser & Mauri, 2015). Com a produção de IL-10, IL-35 e TGF- β , estas células promovem a supressão da expansão de células T patogênicas e de outros linfócitos com perfil pró-inflamatório (Rosser & Mauri, 2015). A população de células Breg é pequena sob condições fisiológicas, mas se expande substancialmente na presença de doenças inflamatórias crônicas, autoimunes, infecções, transplante e câncer (Wang et al., 2020). Em camundongos, vários subgrupos de células Breg produtoras de IL-10 têm sido descritos e, em humanos, os dois principais identificados possuem os fenótipos CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}CD1d^{hi} e CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ (Rosser & Mauri, 2015). As células Breg conhecidas como B10, são as que apresentam a marcação CD5⁺CD1d^{hi} encontradas no baço de camundongos, que correspondem às CD24^{hi}CD27⁺ presentes no sangue humano, tendo a capacidade de produção de IL-10, supressão de células T CD4⁺ efectoras, monócitos e células dendríticas (Rosser & Mauri, 2015).

Diferente das células Treg, ainda não existe um consenso sobre o fenótipo que defina claramente as células Breg, sendo um termo utilizado para se referir às células B que possuem capacidade de regulação (Wang et al., 2020). Muitos marcadores de superfície que têm sido utilizados para a identificação destas células são mais ou menos expressos durante a ativação imune, o que leva a problemas na definição dos subgrupos celulares, colaborando com discrepâncias na sua descrição (Rosser & Mauri, 2015). Como ainda não foi identificada a expressão de algum fator de transcrição específico das células Breg, supõe-se que estas células podem se diferenciar em resposta aos estímulos do ambiente (Rosser & Mauri, 2015), não sendo uma linhagem estável, mas sim um estado de transição (Wang et al., 2020). Plasmablastos, células B imaturas e maduras podem se diferenciar em células Breg produtoras de IL-10, e os principais sinais de ativação envolvem a sinalização via TLR e/ou CD40, podendo também as citocinas pró-inflamatórias induzir a diferenciação (Rosser & Mauri, 2015). Como todos os subgrupos de células B podem adquirir essa capacidade de regulação ou de função efectora, as células B são agora divididas em células Breg e células B efectoras (B_{eff}) (Wang et al., 2020). Devido à dificuldade de distinção entre estas populações, a expressão de citocinas é utilizada para identificar

os dois grupos. Enquanto as células Breg produzem predominantemente IL-10, IL-35 e TGF- β , as células Beff produzem IL-6, TNF- α e IFN- γ (Wang et al., 2020). A IL-10 é fundamental para as funções imunossupressoras das células Breg, e vários estudos utilizam a expressão de IL-10 como um marcador para a identificação destas células (Wang et al., 2020).

2.8.1 Papel das células Breg na autoimunidade e infecções

Um estudo mostrou que células B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} de indivíduos saudáveis exibem capacidade de supressão da diferenciação de células Th1 com o auxílio da IL-10, mas quando isoladas de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico mostraram função supressora prejudicada, com menor expressão de IL-10 (Blair et al., 2010). Outro estudo utilizando amostras de indivíduos saudáveis também mostrou essa capacidade de supressão das células B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}, que suprimiram a proliferação de células T CD4⁺CD25⁻ e a produção de IFN- γ e TNF- α , mediada parcialmente pela IL-10 secretada por estas células Breg (Flores-Borja et al., 2013). A IL-10 também auxiliou na inibição da diferenciação das células T *naive* em Th1 e Th17, e na indução da geração de células Treg (Flores-Borja et al., 2013). Quando amostras de pacientes com artrite reumatoide ativa foram analisadas e comparadas com pacientes com a doença inativa e saudáveis, uma redução nos números de células B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} circulantes foi observada (Flores-Borja et al., 2013). Estas células Breg nos pacientes com a doença ativa foram capazes de suprimir a produção de IFN- γ e TNF- α pelas células T CD4⁺CD25⁻, e a diferenciação em Th1, mas incapazes de prevenir o desenvolvimento de células Th17, e de induzir a diferenciação das células Treg; sugerindo uma falha na prevenção de respostas autorreativas e inflamação, o que contribui para a autoimunidade (Flores-Borja et al., 2013).

No caso da anemia aplásica, uma outra doença autoimune causada pelos linfócitos T citotóxicos que destroem as células tronco, há uma redução das células Breg CD24^{hi}CD38^{hi} principalmente nos pacientes com a doença grave, sugerindo que essa deficiência pode contribuir para a sua fisiopatologia, uma vez que estas células são importantes na supressão de respostas autorreativas (Zaimoku et al., 2020). Já na infecção pelo HCV, a frequência de células Breg CD24^{hi}CD27⁺ aumentou significativamente e se correlacionou positivamente com a carga viral e alterações do

perfil hepático (Fang et al., 2020). Essa contribuição para a infecção também foi observada em pacientes HIV⁺, nos quais foram encontradas altas frequências de células Breg CD24^{hi}CD38^{hi} expressando IL-10, e que atenuam as funções dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos essenciais para o controle da replicação viral (Siewe et al., 2013). De uma mesma maneira, células Breg que expressam PD-L1 são encontradas em altas proporções nos pacientes com melanoma e estão associadas com a gravidade da doença (Wu et al., 2020). Muitas evidências em modelos animais sugerem que o infiltrado de células B em tumores exerce grandes efeitos na imunidade antitumoral, e com a identificação dos subgrupos de células Breg e suas propriedades inibitórias da resposta imune, permitirá o uso de terapias que controlem sua função supressora (Zhang et al., 2015).

2.8.2 Células Breg e malária

A presença das células Breg e seus efeitos durante a malária humana ainda não foi investigada, sendo realizada somente em modelos murinos experimentais, que mostraram um papel benéfico durante a malária grave pelo fato destas células inibirem a exacerbada resposta inflamatória (Soares et al., 2017). Na infecção por *P. berghei* ANKA, foi observada uma expansão de células Breg produtoras de IL-10 e, com a transferência destas células para os camundongos um dia antes da infecção, uma significativa redução no acúmulo de células NK e T CD8⁺, assim como da hemorragia no tecido cerebral, corroborou com a sobrevivência, mesmo com a parasitemia inalterada nestes animais (Liu et al., 2013). A transferência adotiva de células Treg não preveniu o desenvolvimento da malária cerebral (Liu et al., 2013). Para estudar o papel das células Breg durante uma malária que não se desenvolve para doença grave, um outro estudo avaliou estas células na infecção murina por *P. chabaudi* (Han et al., 2018). Eles viram que esta infecção induziu células Breg produtoras de IL-10, e os camundongos BALB/c, que possuem uma resposta mais Th2 frente a esta espécie, mostraram maior susceptibilidade à infecção com forte resposta de IL-10 quando comparados com a linhagem C57BL/6, que induz uma resposta mais Th1 (Han et al., 2018). A transferência adotiva de células Breg para os camundongos C57BL/6 na fase inicial da infecção, levou a um aumento transiente da parasitemia e supressão da resposta Th1, mas sem impacto na taxa de sobrevivência (Han et al., 2018).

Diante das diferentes populações de células Breg com características fenotípicas específicas, se torna importante tentar comparar algumas delas dentro de uma mesma linha de investigação. O estudo de Hasan e colaboradores (2019) mostrou que as células Breg humanas, com fenótipo CD24^{hi}CD27⁺ e CD24^{hi}CD38^{hi}, são as principais células B produtoras de IL-10, e ambas suprimem as respostas de células T CD4⁺ bem como a expressão de citocinas inflamatórias (Hasan et al., 2019). Contudo, as células Breg CD24^{hi}CD27⁺ mostraram ser mais eficientes, expressando também altos níveis de integrinas de superfície e de CD39 (uma ecto-ATPase expressa em células supressoras), sugerindo que o mecanismo de ação *in vivo* destas duas células pode não ser o mesmo (Hasan et al., 2019). A enzima CD39 em conjunto com a CD73 contribui para a supressão de um ambiente inflamatório mediado pelo ATP extracelular, que é metabolizado por estas ectoenzimas para a geração de adenosina, uma molécula imunossupressora (Zhao et al., 2017). A alta expressão de CD39 em células Breg está relacionada com maior produção de IL-10 e de adenosina, quando comparadas com células Breg negativas para CD39 ou com expressão intermediária (Figueiró et al., 2016). Estas células Breg CD39^{hi} também mostraram ser capazes de suprimir a ativação e proliferação de células T CD4⁺ efetoras (Figueiró et al., 2016). A expressão desta ectoenzima nas diferentes subpopulações de células B dos pacientes com malária ainda não foi estudada, e pode contribuir para as respostas anti-inflamatórias observadas, principalmente na infecção pelo *P. vivax*.

Como em algumas situações as células Breg apresentam um papel protetor e em outras acabam associadas com o aumento da gravidade da doença, o desenvolvimento de tratamentos, e até mesmo de vacinas direcionadas para estas células, deve ser avaliado com muita cautela (Soares et al., 2017).

2.9 Memória imunológica desencadeada pela malária

A frequência das reinfecções pelo *Plasmodium* sugere que a imunidade ao parasito possui uma vida curta ou pouco eficiente. Além da resposta imune não ser esterilizante, os indivíduos que deixam as áreas endêmicas podem perder as respostas de células T e B, sugerindo que para a manutenção da imunidade é preciso uma exposição contínua aos antígenos do parasito (revisto por Antonelli et al., 2020). Evidência de aquisição da imunidade contra a malária após um único episódio de exposição ao parasito, foi primeiramente observada nos pacientes sujeitos à infecção

por *Plasmodium* para o tratamento da sífilis, uma ferramenta utilizada entre os anos de 1920 e 1960 antes da disponibilização de antibióticos, mostrando que a imunidade adquirida reduzia a parasitemia e os sintomas clínicos da seguinte exposição (Scholzen & Sauerwein, 2016). Estudos que utilizam a infecção por malária humana controlada auxiliam no entendimento do desenvolvimento da resposta imune, e já mostraram a indução de respostas de células T e B de memória nos voluntários após uma única infecção, e que foram mantidas por prolongados períodos de tempo mesmo na ausência de reexposição ao parasito (Scholzen & Sauerwein, 2016).

A resposta de células B frente à malária pode ser disfuncional ou subótima, com comprometimento na geração de células de memória de vida longa (Pérez-Mazliah et al., 2020). Muitos estudos mostraram que os títulos de anticorpos anti-*Plasmodium* caem rapidamente após a infecção aguda, sendo mantidos apenas nos casos de infecção persistente (Pérez-Mazliah et al., 2020). Anticorpos podem ser produzidos por plasmócitos de vida longa a partir da resposta de memória como também por plasmablastos e plasmócitos de vida curta, por isso a diminuição dos níveis de anticorpos não representa necessariamente um defeito nos plasmócitos de vida longa e sim uma contração da resposta de células B (Pérez-Mazliah et al., 2020). Um aumento nos títulos de anticorpos pode ser observado nos casos de infecções posteriores, muito comuns em locais de transmissão sazonal, após surtos e em viajantes, o que fortemente indica resposta de células B de memória (Pérez-Mazliah et al., 2020). Memória imunológica de longa duração foi observada em adultos com mais de 40 anos que viveram sua infância em Madagascar antes das medidas de controle serem introduzidas (Deloron & Chougnet, 1992). Quando a malária reapareceu após muitos anos de seu completo controle, estes adultos mostraram ser mais resistentes à doença clínica do que os jovens e as crianças que foram expostos pela primeira vez (Deloron & Chougnet, 1992). A prévia exposição ao parasito pode prevenir o risco de doença grave mesmo após muitos anos da primeira infecção, com sintomas mais brandos e resolução mais rápida da doença (Struik & Riley, 2004). Indivíduos não reexpostos também podem apresentar níveis estáveis de células B de memória e anticorpos específicos para *Plasmodium*, indicando que o sistema imune é capaz de gerar memória imunológica (Pérez-Mazliah et al., 2020).

Adultos parecem montar esta resposta de vida longa de uma maneira mais eficaz do que as crianças, mas ainda não está claro se esse fenômeno é devido à maturidade do sistema imune, número de episódios de infecções, ou uma combinação

dos dois fatores (Pérez-Mazliah et al., 2020), pois em relação à imunidade específica de linhagem, a doença febril e a alta parasitemia nas crianças estão associadas com a infecção por um novo genótipo do parasito (Struik & Riley, 2004). A expansão de células B de memória atípica está correlacionada com o grau de exposição ao *Plasmodium* (Weiss et al., 2009), e foi sugerida como a razão para a disfunção na resposta de células B contra a malária (Pérez-Mazliah et al., 2020). Apesar do seu papel ainda permanecer controverso, um estudo mostrou que estas células podem contribuir para a proteção contra a malária pela sua capacidade de secretar anticorpos neutralizantes (Muellenbeck et al., 2013). Como apenas a resposta de células B pode não ser suficiente para o controle da infecção pelo *Plasmodium*, é necessário a modulação dos outros braços da imunidade para auxiliar na proteção (Pérez-Mazliah et al., 2020).

A caracterização do perfil de células T de memória em pacientes com malária vivax mostrou que, durante a fase aguda, há uma alta frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória imaturas e maduras, indicando que a infecção não suprimiu estas células e que a prévia exposição ao parasito mantém células T de memória em altos níveis, já que foram detectadas também em controles imunes moradores de área endêmica (Jangpatarapongsa et al., 2006). Estas células podem estar contribuindo com o controle da parasitemia pelas suas funções auxiliaadoras das respostas de anticorpos, como também citotóxicas (Jangpatarapongsa et al., 2006).

A infecção pelo *Plasmodium* pode interferir na geração de células T de memória efetora e nas respostas de anticorpos de maneiras diferentes. A nível de células dendríticas, estudos mostram tanto ativação, supressão e apoptose destas células, que acaba interferindo na capacidade e na eficiência da geração de células T CD4⁺ de memória (Langhorne et al., 2008). O desenvolvimento de uma eficiente resposta de memória de longa duração, também pode depender da habilidade tanto do patógeno quanto de uma vacina em induzir a produção das citocinas corretas para a geração de células T auxiliares de memória (Langhorne et al., 2008).

De acordo com os dados disponíveis sobre a resposta imune gerada na infecção pelo *Plasmodium*, é sugestivo de que há um comprometimento das células B de memória, e pelo fato das células T_{fh} serem fundamentais para uma eficiente indução destas células de alta afinidade, e também de plasmócitos de longa duração, a busca pelo entendimento dos fatores que influenciam esta resposta ineficiente da imunidade humoral frente a malária tem sido o foco de alguns estudos (Hansen et al.,

2017). A compreensão dos mecanismos da imunidade ao *Plasmodium* mediada por células pode ser importante para o desenvolvimento de vacinas, bem como de drogas antimaláricas (Jangpatarapongsa et al., 2006). Com a descoberta de como induzir e manter os níveis de anticorpos protetores, um melhor suporte será oferecido para a produção de uma vacina efetiva e que seja capaz de fornecer proteção de longa duração contra a malária (Pérez-Mazliah et al., 2020).

2.10 Vacinas contra malária

O desenvolvimento de vacinas contra a malária é um grande desafio, principalmente pela complexidade do parasito que possui múltiplos estágios expressando variados antígenos específicos em cada um deles. A vacina pode ter como alvo três diferentes formas do *Plasmodium*, que permitirá o desenvolvimento de variadas estratégias de controle. Sendo assim, vacinas contra a forma pré-eritrocítica, estágio sanguíneo e de bloqueio da transmissão estão sendo estudadas. O estágio pré-eritrocítico, que envolve tanto os esporozoítos quanto os estágios hepáticos, é considerado o gargalo da transmissão por estarem presentes em números muito pequenos no indivíduo infectado, assim, são alvos ideais para a geração de vacinas que impedem o desenvolvimento da doença no hospedeiro (Ménard et al., 2013). Os mecanismos de proteção envolvem a resposta de anticorpos contra os esporozoítos para a prevenção da infecção nos hepatócitos, como também a destruição das células infectadas pelos linfócitos T citotóxicos, evitando assim a propagação da infecção no sangue (Frimpong et al., 2018). As vacinas voltadas para o estágio sanguíneo têm como objetivo limitar a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos e diminuir a replicação do parasito, prevenindo a doença e também o desenvolvimento de gametócitos, o que contribui para o controle da transmissão (Draper et al., 2018; Mueller et al., 2015). A motivação para o desenvolvimento de vacinas para este estágio, se baseia nas evidências da imunidade adquirida naturalmente após repetidas infecções, que confere uma malária com poucos sintomas ou até mesmo em infecções assintomáticas (Frimpong et al., 2018). Já as estratégias de vacinas que têm como alvo os estágios sexuais, não contribuem para a prevenção da doença, mas sim da transmissão, pois o objetivo é prevenir o desenvolvimento do esporozoíto no interior do mosquito vetor (Draper et al., 2018), atuando como uma vacina altruística por não

proteger diretamente o próprio indivíduo, mas por contribuir com a interrupção do ciclo do parasito.

2.10.1 Principais antígenos candidatos para vacina contra *P. falciparum*

Os candidatos para vacinas contra a fase pré-eritrocítica são direcionados para antígenos do *Plasmodium* presentes nos esporozoítos e no estágio hepático, sendo a proteína CS o componente central das estratégias vacinais, bem como a administração do próprio esporozoíto inteiro após sua atenuação por diferentes técnicas (Draper et al., 2018; Duffy & Patrick Gorres, 2020). Estes esporozoítos mantêm a capacidade de infectar hepatócitos, mas como não amadurecem totalmente no interior destas células, não ocorre a formação dos merozoítos, que são os responsáveis pelo desenvolvimento da doença clínica (Frimpong et al., 2018). Contudo, mesmo tendo esta estratégia mostrado evidências de que induz imunidade esterilizante, existem muitos desafios logísticos e de custo para sua implementação, como a produção em larga escala dos parasitos, armazenamento em nitrogênio líquido e a via intravenosa do inóculo (Duffy & Patrick Gorres, 2020). Uma outra alternativa de vacina contra a forma pré-eritrocítica é a indução de uma forte resposta de células T CD8⁺ contra os hepatócitos infectados e, para isso, estratégias utilizando diferentes vetores virais expressando antígenos do *Plasmodium*, essenciais para a infecção dos hepatócitos, têm sido utilizadas (Draper et al., 2018). A principal estratégia envolve o uso de adenovírus de chimpanzé sorotipo 63 (ChAd63) na primeira imunização, e um reforço com o vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA), que expressam a proteína de adesão relacionada à trombospondina ligada a uma sequência de múltiplos epítomos (ME-TRAP). Entretanto, o grau de proteção variou entre diferentes países onde a vacina foi testada, permanecendo indefinido se a ME-TRAP é um bom antígeno de escolha (Draper et al., 2018). Outros antígenos bem caracterizados também podem ser expressos por estes vetores, como a proteína CS e aqueles presentes durante o estágio sanguíneo, MSP1 e AMA1, que têm sido o foco de outros estudos (Draper et al., 2018).

Como a forma sanguínea do *Plasmodium* é a verdadeira causa da doença, os parasitos deste estágio acabam sendo alvos atrativos para o desenvolvimento de vacinas. A imunização de macacos com merozoítos inteiros de *P. falciparum* conferiu proteção e, assim, vacinas que interferem na invasão dos merozoítos têm ganhado

atenção (Duffy & Patrick Gorres, 2020). Os principais antígenos presentes nesta fase da infecção que estão sendo estudados como possíveis candidatos vacinais são a MSP1, AMA1, EBA-175, MSP3, PfRH5, AMA1-RON2 e a proteína exportada para a superfície dos eritrócitos infectados PfEMP-1 (Duffy & Patrick Gorres, 2020). Vacinas anti-merozoítos também possuem seus desafios que incluem: curto tempo (segundos) para o acesso dos anticorpos aos merozoítos que são liberados para infectarem outros eritrócitos, polimorfismo antigênico, vias de invasão redundantes, e o grande número de parasitos que precisam ser contidos (Duffy & Patrick Gorres, 2020).

Antígenos de superfície presentes nos gametas e zigotos incorporam as vacinas de bloqueio da transmissão, que têm como objetivo induzir anticorpos capazes de eliminar os parasitos ingeridos pelo repasto sanguíneo realizado pelo mosquito vetor. Dentre estes antígenos, os quatro principais candidatos de *P. falciparum* são: Pfs230 e Pfs48/45, proteínas expressas por gametócitos no sangue humano; e Pfs25 e Pfs28, expressas pelo zigoto após a fertilização no interior do mosquito (Draper et al., 2018; Duffy & Patrick Gorres, 2020). Estudos em animais mostraram que a Pfs25 induziu anticorpos com atividade bloqueadora da transmissão, e que anticorpos específicos para Pfs230 possuem atividade lítica na presença do complemento contra gametas de *P. falciparum* (Duffy & Patrick Gorres, 2020). O principal desafio deste tipo de vacina é induzir uma resposta imune adaptativa suficiente que mantenha altos níveis de anticorpos de longa duração e, como não confere um benefício direto para o indivíduo, a implementação poderia ser combinada com vacinas de fase pré-eritrocítica ou eritrocítica para a prevenção da infecção e redução da transmissão (Duffy & Patrick Gorres, 2020).

2.10.2 A vacina RTS,S para *P. falciparum*

A única e atual vacina comercial para a prevenção da malária é direcionada para o *P. falciparum* e foi projetada na forma de uma partícula semelhante à vírus (VLP, do inglês *virus-like particle*), para direcionar a resposta imune contra a proteína CS, que recobre a superfície dos esporozoítos infectantes (Draper et al., 2018). Esta vacina é denominada RTS,S/AS01 (Mosquirix™), sendo composta por uma porção da proteína CS do *P. falciparum* fusionada com a proteína de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), que atua como um carreador (Laurens, 2020). A vacina foi criada em 1987, através de uma colaboração entre a companhia britânica GlaxoSmithKline

(GSK) e o instituto de pesquisa Walter Reed Army (WRAIR) dos Estados Unidos. Esta criação surgiu a partir das tentativas do desenvolvimento de uma vacina baseada nos estudos que mostraram proteção contra a infecção ao utilizar esporozoítos irradiados (Laurens, 2020). Com a identificação da proteína CS como alvo do sistema imune após a infecção com estes esporozoítos, um mapeamento de epítomos reconhecidos por anticorpos protetores foi realizado baseando-se na região central de repetição da proteína. Dessa forma, várias tentativas foram realizadas para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade mas, com a ausência de eficácia clínica, iniciaram a pesquisa utilizando a estratégia pioneira da GSK baseada na fusão com o HBsAg (Laurens, 2020). De acordo com o nome da vacina, RTS,S/AS01, o “R” representa a região central de repetição em tandem conservada da sequência de aminoácidos NANP da CSP, o “T” representa os epítomos de linfócitos T imunodominantes para CD4⁺ e CD8⁺, e o “S” representa o antígeno de superfície do vírus da hepatite B fusionado ao RT (Laurens, 2020). O outro “S” é a porção dos outros HBsAg fusionados ao complexo RTS, e o AS01 se refere ao adjuvante escolhido, que mostrou ser o mais imunogênico e seguro (Laurens, 2020).

A RTS,S é a primeira vacina contra a malária a ser testada em ensaios clínicos de fase 3, estando agora em estudos de implementação em três países endêmicos da África: Gana, Quênia e Malawi (Laurens, 2020). Apesar da eficácia ser de 25,9% em bebês com 6 a 12 semanas de idade, 36,3% entre as crianças com 5 a 17 meses de idade (após 4 anos de seguimento), e ter como obstáculo a necessidade da administração de pelo menos quatro doses, a vacina oferece muitos benefícios nas áreas de intensa transmissão, contribuindo para a redução dos casos, de admissões hospitalares e de transfusão sanguínea (Laurens, 2020). Altos níveis de anticorpos contra a região de repetição NANP estão associados com a proteção contra a malária (White et al., 2015), assim como respostas de células T CD4⁺ que também mostraram estar aumentadas após a imunização (White et al., 2013). Com um melhor entendimento sobre os mecanismos de eficácia induzidos pela vacina, impacto de novos adjuvantes e plataformas de entrega do candidato vacinal, o principal desafio para estender o tempo de proteção das próximas gerações de vacinas poderá ser superado (Draper et al., 2018).

2.10.3 Candidatos vacinais para *P. vivax*

Apenas dois candidatos para vacina contra a infecção por *P. vivax* foram registrados para testes clínicos desde o ano de 2016, evidenciando a escassez de recursos voltados para a pesquisa desta espécie; fundos que predominantemente são alocados para a pesquisa de *P. falciparum* (Duffy & Patrick Gorres, 2020). A malária causada pelo *P. vivax* também representa um grande desafio para sua eliminação, principalmente devido às recaídas causadas pelos estágios dormentes do parasito no fígado, o aparecimento de gametócitos antes dos sintomas clínicos e um mais curto desenvolvimento do ciclo no mosquito (Draper et al., 2018). Apesar da alta frequência de assintomáticos infectados por *P. vivax*, muitas infecções podem evoluir para casos mais graves e até mesmo à morte, não podendo mais ser considerada como uma doença benigna, o que mostra a necessidade de uma vacina para auxiliar no controle da transmissão (Mueller et al., 2015).

Embora atualmente nenhuma vacina para malária vivax esteja disponível, estudos para seu desenvolvimento têm seguido aqueles realizados para *P. falciparum*, e candidatos já testados em humanos incluem os ortólogos PvCSP e Pvs25, de fase pré-eritrocítica e de bloqueio da transmissão, respectivamente (Duffy & Patrick Gorres, 2020). Vacinas pré-eritrocíticas contra *P. vivax* possuem a vantagem de reduzir não apenas o número de infecções primárias, mas também o risco de recaídas, por evitar o estabelecimento dos hipnozoítos no fígado que contribuem em grande parte das infecções de estágio sanguíneo (Mueller et al., 2015). A candidata VMP001, uma proteína solúvel de PvCSP, mostrou ser imunogênica, mas apesar de um significativo atraso no tempo do aparecimento da parasitemia ser observado, a vacina não foi capaz de induzir proteção estéril contra o desafio com esporozoítos de *P. vivax* (Draper et al., 2018). A CSV-S,S para *P. vivax* é similar à RTS,S para *P. falciparum*, e também não mostrou grandes resultados. Contudo, outras estratégias baseadas na PvCSP estão em progresso, como a Rv21, que é semelhante à CSV-S,S, mas possui maior densidade da proteína CS na superfície da VLP (Draper et al., 2018), e uma candidata universal, que cobre as três variantes da PvCSP conferindo proteção em murinos (Gimenez et al., 2021). Com a identificação de epítomos de células B e T presentes na PvCSP e a produção de peptídeos sintéticos longos, possíveis candidatos vacinais podem ser desenvolvidos, tendo alguns estudos já mostrado a capacidade de induzir a produção de anticorpos específicos que reconhecem também

a proteína CS nativa (Mueller et al., 2015). Os epítomos específicos de células B e T são importantes para estimular a resposta imune, permitindo o reconhecimento pelas moléculas do MHC de classe I e II (López et al., 2017).

A proteína TRAP de *P. vivax* (PvTRAP) é uma outra candidata para vacina de estágio pré-eritrocítico, tendo sido testada em modelos experimentais na forma de peptídeo sintético longo e expressa em vetores virais (López et al., 2017). Esta última estratégia foi a que induziu uma melhor resposta imune, com boa produção de IFN- γ e TNF- α por linfócitos T CD8⁺ e altos títulos de anticorpos específicos (López et al., 2017). Em relação à vacina candidata Pvs25, para bloqueio de transmissão, uma resposta modesta de atividade bloqueadora que se correlacionou com a concentração de anticorpos foi observada (Duffy & Patrick Gorres, 2020). Além de todas estas vacinas candidatas, futuros testes com a Pvs230D1-EPA de *P. vivax* poderão ser iniciados em breve, com base no progresso clínico que houve com a vacina Pfs230D1-EPA de *P. falciparum* para bloqueio de transmissão (Duffy & Patrick Gorres, 2020).

O maior foco das vacinas para o estágio sanguíneo do *P. vivax* está sobre a DBP, uma proteína importante para a invasão dos reticulócitos pelos merozoítos, tendo dois candidatos concluído os testes da fase 1 (Duffy & Patrick Gorres, 2020), que incluem um vetor viral (Payne et al., 2017) e uma proteína recombinante (Singh et al., 2018). Ambos induziram anticorpos neutralizantes e, além disso, após a dose de reforço, a vacina baseada em vetor viral foi capaz de induzir resposta de células T produtoras de IFN- γ específicas para a região II da DBP (DBPII), assim como células B de memória (Payne et al., 2017). Com o intuito de melhorar estes imunógenos, estudos têm identificado epítomos funcionais e não funcionais a partir de anticorpos monoclonais humanos, obtidos por vacinação ou exposição natural ao parasito (Rawlinson et al., 2019; Urusova et al., 2019). A região II da DBP é a que interage com o antígeno Duffy presente na superfície do reticulócito, e por se tratar de uma região conservada, a indução de anticorpos inibitórios específicos para DBPII pode ser efetiva contra a infecção por diversas linhagens de *P. vivax* (Mueller et al., 2015). Como outras vias alternativas de invasão dos reticulócitos pelo *P. vivax* podem estar sendo utilizadas, se torna necessário o bloqueio destas vias juntamente com o da DBP (Mueller et al., 2015).

A família da MSP e a AMA1, são outras proteínas expressas pelos merozoítos que também estão sendo estudadas como candidatas vacinais. A MSP1 está abundantemente presente na superfície dos merozoítos, sendo associada com a

aquisição natural de resposta imune humoral e celular (López et al., 2017; Mueller et al., 2015). A imunogenicidade contra seus diferentes fragmentos, sendo alguns deles fusionados com epítopos de células T, foi testada em animais e induziu resposta de anticorpos e proteção, porém, apenas testes clínicos após o desafio natural ou artificial servirão como prova final do conceito (Mueller et al., 2015). As proteínas MSP3 e MSP9, presentes na superfície dos merozoítos, também são antígenos com potencial para geração de vacinas, sendo que anticorpos naturalmente adquiridos específicos para estas proteínas estão associados com a proteção da malária vivax (Mueller et al., 2015). Testes em camundongos envolvendo a proteína AMA1 mostraram sua capacidade de geração de anticorpos de longa duração, inibição da invasão celular de diversas linhagens de *P. vivax* conferida por anticorpos, e resposta de células T de memória (Mueller et al., 2015).

A combinação de múltiplos antígenos que não estão apenas envolvidos na invasão de reticulócitos, mas também em outros estágios do ciclo, provavelmente será necessária para o alcance de uma vacina altamente eficaz, que proteja o indivíduo da doença e que seja capaz de inibir a transmissão (López et al., 2017; Mueller et al., 2015). Com a escassez de antígenos candidatos para a geração de vacinas contra o *P. vivax*, a busca por novos alvos e o estudo sobre a resposta imune induzida por estas proteínas auxiliará na compreensão dos tipos de respostas que conferem proteção, e também no desenvolvimento de novas estratégias vacinais mais eficazes.

2.11 Principais proteínas de estágio sanguíneo do *P. vivax*

A resposta mais abundante de anticorpos é observada durante a fase eritrocítica da infecção, quando ocorre a expansão exponencial dos merozoítos devido ao ciclo contínuo de reinvasão e multiplicação no interior dos reticulócitos. Dentre os antígenos expostos ao sistema imune presentes nesta fase, estão as proteínas PvAMA1, PvDBP e PvMSP1 (**Figura 8A**), que têm sido o foco da maioria dos estudos relacionados ao *P. vivax* (Antonelli et al., 2020). Várias interações moleculares estão envolvidas no rápido processo de invasão dos eritrócitos pelos merozoítos, um mecanismo que ocorre em menos de 1 minuto, passando por diferentes etapas: 1) uma adesão inicial do parasito ao eritrócito; 2) reorientação apical (extremidade anterior); 3) formação da junção, que se move ao longo do parasito; e 4) invasão pela invaginação da membrana eritrocítica resultando num vacúolo (Cowman & Crabb,

2006; Dvorak et al., 1975) (**Figura 8B**). O contato inicial entre o merozoíto e a célula hospedeira pode acontecer em qualquer parte do parasito, sendo reversível e provavelmente mediada por moléculas expressas na sua superfície, como a MSP1 (Gaur et al., 2004). Após esta adesão inicial, a reorientação apical é uma etapa necessária antes da invasão, na qual as interações moleculares responsáveis por este mecanismo ainda não são bem compreendidas, mas evidências mostram que a AMA1 pode estar diretamente relacionada (Mitchell et al., 2004). Na extremidade apical se encontram os micronemas, que contém adesinas envolvidas na ligação ao eritrócito, e as roptrias, que são liberadas após o engajamento inicial para facilitar o processo de invasão (Cowman et al., 2017) (**Figura 8A e B**). Assim, com o polo apical do merozoíto devidamente posicionado, as interações dos ligantes presentes no complexo apical com os receptores dos eritrócitos induzem a formação da junção móvel, uma etapa irreversível que compromete o parasito à invasão celular, na qual a AMA1 e a DBP mostraram possuir um papel funcional na formação desta junção (Cowman & Crabb, 2006; Gaur et al., 2004) (**Figura 8B**).

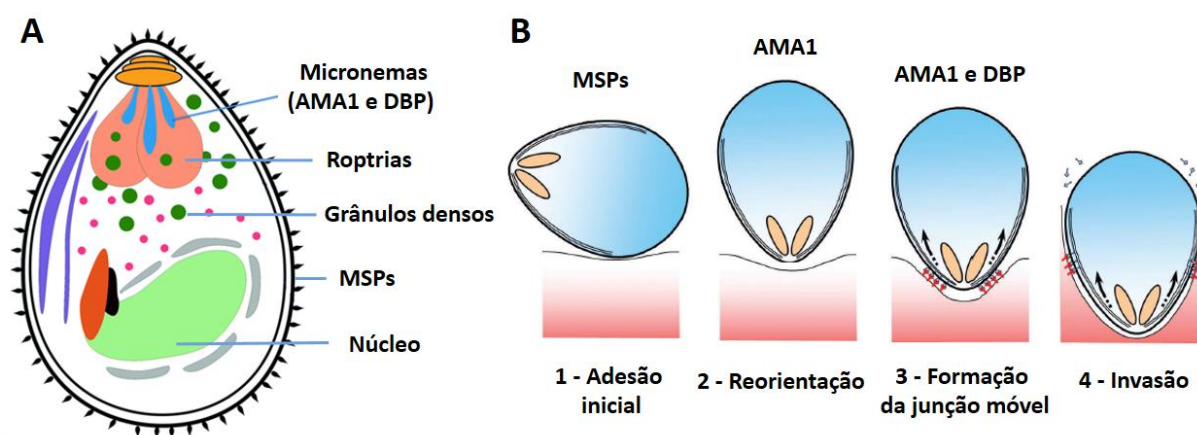


Figura 8 - Estrutura do merozoíto de *Plasmodium* e representação esquemática das etapas do processo de invasão do eritrócito pelo merozoíto. Proteínas e organelas presentes no merozoíto (**A**). Processo de invasão realizado pelo merozoíto (**B**). Fonte: Adaptado de J. H. Chen et al. (2015) (**A**) e Wright & Rayner (2014) (**B**).

Diante disso, para o desenvolvimento do nosso trabalho, escolhemos estas três proteínas, AMA1, DBP e MSP1, expressas pelo *P. vivax* e importantes para o processo de infecção dos eritrócitos pelos merozoítos, que serão descritas neste tópico para um melhor entendimento sobre suas características estruturais, funcionais e de capacidade imunogênica.

2.11.1 MSP1

O primeiro membro da família de MSP a ser descoberto no *Plasmodium* foi a MSP1, uma proteína muito abundante na superfície do merozoíto e importante para o processo de invasão dos eritrócitos, pois medeia a interação inicial com a célula hospedeira (Gaur et al., 2004). A MSP1 é sintetizada logo no início da esquizogonia como uma proteína de aproximadamente 200 kDa (del Portillo et al., 1988), sendo associada com a MSP6 e MSP7 e transportada para a superfície do esquizonte em desenvolvimento, onde permanece ligada à membrana plasmática por uma âncora de GPI (Holder, 2009). No final da esquizogonia, logo antes da liberação dos merozoítos da célula infectada, ocorre o primeiro processamento deste complexo, com alguns produtos permanecendo associados à superfície do parasito. A partir desta primeira clivagem, a MSP1 dá origem à quatro fragmentos, de 83 kDa, 30 kDa, 38 kDa e 42 kDa (Holder et al., 1992) (**Figura 9**), um processo que ainda não se sabe o significado, mas que possivelmente confere mudança conformacional para a aquisição ou troca de função desta proteína, que nesta etapa se encontra presente na superfície do merozoíto livre (Holder, 2009). No momento da invasão do eritrócito, um segundo processamento cliva a porção C-terminal de 42 kDa da MSP1 (MSP1-42), gerando um fragmento N-terminal de 33 kDa (MSP1-33), que é liberado junto ao restante do complexo MSP1 (Michael J. Blackman et al., 1991), e um fragmento C-terminal de 19 kDa (MSP1-19), que é mantido pela sua âncora de GPI na superfície do merozoíto e levado para o interior do eritrócito a ser infectado (M J Blackman et al., 1990) (**Figura 9**). Este segundo processamento da MSP1 mostra ser importante para a invasão do parasito, diante do fato de que anticorpos específicos para a MSP1-19 podem inibir a infecção das células vermelhas (Blackman et al., 1990). Proteínas que possuem domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF-like, do inglês *epidermal growth factor-like*), geralmente estão envolvidas na ligação de receptores ou outras interações na superfície celular. A MSP1-19 possui dois domínios EGF-like que mostraram ser funcionalmente importantes para a ligação aos eritrócitos (Han et al., 2004).

Como a MSP1 está presente na superfície dos merozoítos livres, anticorpos específicos para esta proteína são gerados e, a partir do seu reconhecimento e ligação ao antígeno, diferentes mecanismos de ação destes anticorpos podem ser desencadeados para inibir o crescimento do parasito. Esses anticorpos podem

interferir no processo de invasão ou até mesmo no desenvolvimento intracelular, que envolvem: a aglutinação dos merozoítos, prevenindo a dispersão após o rompimento dos esquizontes; a interrupção da interação da MSP1 com outras moléculas do parasito e receptores dos eritrócitos; a inibição do processamento secundário da MSP1, afetando a invasão do eritrócito; e a interferência no crescimento do parasito após a invasão, que pode estar relacionada aos anticorpos ligados à MSP1-19 que acabam sendo carregados para o interior da célula infectada (Holder, 2009). Além destes mecanismos, os anticorpos anti-MSP1 podem opsonizar merozoítos livres e reticulócitos infectados, aumentando a fagocitose e a destruição dos parasitos pelos macrófagos (revisto por Antonelli et al., 2020), como também podem promover o depósito do complemento sobre os merozoítos impedindo que ocorra a infecção dos eritrócitos (Cowman et al., 2017).

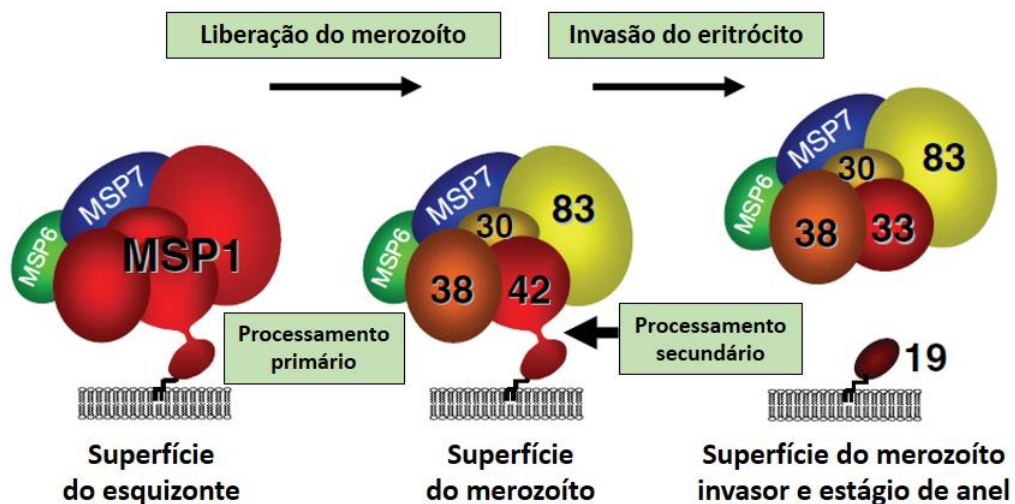


Figura 9 - Processamento do complexo da MSP1. Fonte: Adaptado de Holder (2009).

Altos níveis de anticorpos específicos para a MSP1 são gerados após a infecção natural pelo *P. vivax*, como identificado por diversos estudos que analisaram o soro ou plasma de indivíduos expostos à malária (J. H. Chen et al., 2011; Fernandez-Becerra et al., 2010; Soares et al., 1997; Wang et al., 2016). Tanto a região N-terminal quanto a C-terminal da MSP1 podem ser reconhecidas pelos anticorpos IgG presentes no soro dos pacientes. A maior frequência de respondedores reconhece a região C-terminal, e de acordo com o número de episódios prévios de malária, esta frequência de reconhecimento aumenta (Soares et al., 1997). Quando se compara a resposta para os dois fragmentos da MSP1-42, os níveis de anticorpos para a PvMSP1-19 são

muito mais altos do que aqueles detectados para a PvMSP1-33 (Dinzouna-Boutamba et al., 2016), o que pode ser justificado pelo alto grau de polimorfismo nesta região de 33 kDa (Kang et al., 2012; Murhandarwati et al., 2020) e limitada variação genética da MSP1-19, para a qual os anticorpos específicos são direcionados principalmente para os epítomos conservados deste fragmento (I. S. Soares, Barnwell, et al., 1999). Uma queda dos níveis de anticorpos anti-MSP1-19 foi observada dois meses após o tratamento da malária vivax, com quase 45% dos pacientes sendo soronegativos (Soares, Cunha, et al., 1999). Ao avaliar a longevidade dos anticorpos que reconhecem a região C-terminal da MSP1 do *P. vivax*, um estudo mostrou que os mesmos podem persistir por mais de 30 anos na ausência de reinfecção (Lim et al., 2004). IgG1 e IgG3 são as principais subclasses de IgG específicas para PvMSP1-19 detectadas em indivíduos com diferentes níveis de exposição à malária, sem nenhuma diferença na distribuição das quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) entre pacientes infectados sintomáticos, assintomáticos, e não infectados, moradores da mesma área endêmica (Morais et al., 2005).

Ainda não foi encontrada nenhuma associação entre resposta de anticorpo para a PvMSP1-19 com o reduzido risco de infecção pelo *P. vivax* ou de hiperparasitemia (revisto por Antonelli et al., 2020). Entretanto, um estudo com seguimento de um ano, demonstrou que a resposta imune humoral adquirida naturalmente contra a região N-terminal da PvMSP1 está associada com um menor risco de infecção e/ou proteção contra a malária clínica causada pelo *P. vivax*, com a maioria dos pacientes apresentando predominantemente anticorpos da subclasse IgG3 neste reconhecimento (Nogueira et al., 2006). Mas, apesar da resposta de anticorpos contra a porção C-terminal não estar associada com a proteção, esta região da MSP1 é a mais imunogênica, tendo capacidade de impulsionar a resposta imune nas infecções subsequentes (Nogueira et al., 2006).

Com relação à resposta imune celular, a análise *in vitro* mostrou que ambas regiões da MSP1 são capazes de induzir proliferação e produção de IFN- γ . Este mesmo estudo sugeriu que a região C-terminal, que contém dois domínios EGF-like, é particularmente imunogênica para os anticorpos e células T durante a infecção pelo *P. vivax* (Soares et al., 1997). Outro estudo também mostrou a capacidade da PvMSP1-19 em induzir forte ativação da resposta imune celular, com produção de TNF pelas células sanguíneas provenientes de pacientes com malária vivax aguda, e

com uma frequência de células T CD4⁺ ativadas maior do que de células T CD8⁺ (Ricchio et al., 2013).

Com a identificação da proteína paróloga da MSP1 de *P. vivax* (PvMSP1P), a resposta imune naturalmente adquirida específica para seus fragmentos também foi avaliada. O soro de pacientes com malária vivax reagiu fortemente para o fragmento de 83 kDa da região N-terminal e para os dois fragmentos da região C-terminal, de 33 e 19 kDa (MSP1P-19), sendo capaz de inibir a ligação da MSP1P-19 aos eritrócitos nos ensaios *in vitro*, mostrando que esta porção da proteína também é importante para a adesão do parasito (Cheng et al., 2013). A resposta imune celular específica para PvMSP1P-19 é fortemente induzida nos pacientes recuperados da infecção pelo *P. vivax*, desde que células produtoras de IFN- γ foram observadas após o estímulo com a proteína, uma resposta de memória celular efetora com perfil Th1 que desempenha um papel importante na eliminação do parasito (Changrob et al., 2015).

2.11.2 AMA1

O antígeno 1 de membrana apical é uma proteína de membrana estruturalmente conservada, que varia entre 556 a 563 aminoácidos na maioria das espécies de *Plasmodium*, sendo comum para todos os parasitos do filo Apicomplexa (Chesne-Seck et al., 2005). Sua expressão ocorre nos estágios de esporozoítio e merozoítio, sendo essencial para a invasão dos hepatócitos (Silvie et al., 2004) e eritrócitos (Triglia et al., 2000), respectivamente. Como a função da AMA1 pode ser muito similar ou até mesmo idêntica nas fases pré-eritrocítica e eritrocítica, esta proteína pode servir como uma vacina efetiva contra estes dois estágios importantes para a infecção (Chesne-Seck et al., 2005).

A AMA1 é composta por uma região citoplasmática, domínio transmembrana, e um ectodomínio contendo 16 resíduos de cisteínas conservados. Estas cisteínas formam 8 pontes dissulfeto que dividem o ectodomínio em três domínios distintos (DI, DII e DIII) (Hodder et al., 1996). Durante o final da esquizogonia é quando ocorre a expressão máxima da AMA1, sintetizada inicialmente como uma proteína de 83 kDa que é transportada para a superfície do parasito próximo ao momento de ruptura do esquizonte e liberação dos merozoítos (Narum & Thomas, 1994). A AMA1 está presente no interior de vesículas chamadas de micronemas, que fazem este transporte até o complexo apical dos merozoítos, que juntamente com as roptrias,

descarregam seu conteúdo neste local durante a invasão celular (Bannister et al., 2003). Com isso, a junção móvel é formada pela interação entre a superfície da célula hospedeira e a do parasito, onde a ligação da AMA1 com a proteína 2 das roptrias (RON2, do inglês *roptry neck protein 2*) é fundamental para este mecanismo de invasão celular (Lamarque et al., 2011). Além disso, um estudo mostrou que a AMA1 pode exercer um papel importante para a reorientação apical do merozoíto, que precede a formação da junção. Este fenômeno foi observado a partir de experimentos, em que a presença de um anticorpo monoclonal específico para AMA1 impediu a reorientação dos merozoítos e conseqüentemente a formação da junção, mas sem interferir no contato inicial com os eritrócitos (Mitchell et al., 2004). Momentos antes da invasão, a AMA1 de 83 kDa sofre um processamento no qual perde o fragmento N-terminal, uma pró-sequência, se convertendo na forma de 66 kDa que é realocada para a superfície do merozoíto, podendo ser clivada em uma das duas posições alternativas, resultando nos fragmentos solúveis de 44 ou 48 kDa (Howell et al., 2001). Assim, estes fragmentos clivados são liberados da superfície do parasito, ficando apenas os domínios transmembrana e citoplasmático, com ou sem o domínio III aderido, que são carregados para o interior da célula hospedeira a ser invadida (**Figura 10**) (Howell et al., 2001).

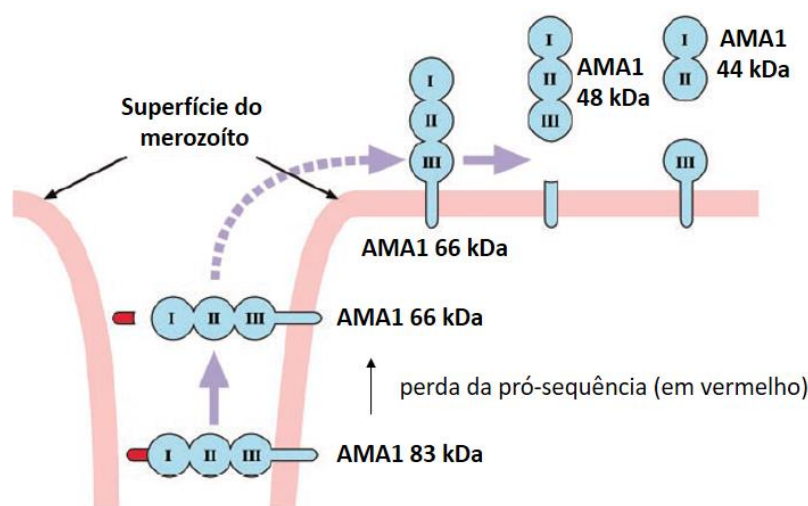


Figura 10 - Processamento proteolítico da AMA1. Fonte: Adaptado de Howell et al. (2001).

Uma outra função da AMA1 pode estar relacionada à sua capacidade de ligação à molécula CD71, presente na superfície dos reticulócitos. Foi demonstrado que as regiões da proteína responsáveis por esta interação são os domínios I e II, e que um peptídeo conservado presente no DI possui capacidade de bloquear a ligação

da proteína recombinante PvAMA1-DI-DII aos reticulócitos e de impedir a formação de rosetas, mostrando que esta é uma interação específica e de alta afinidade (Arévalo-Pinzón et al., 2017). O CD71 é um receptor de transferrina, que recentemente foi identificado como um receptor importante utilizado pelo *P. vivax* para a infecção dos reticulócitos (Gruszczyk et al., 2018). Este estudo mostrou que a proteína 2b de ligação ao reticulócito (RBP2b, do inglês *reticulocyte-binding protein 2b*) se liga ao CD71, e que o bloqueio desta interação utilizando anticorpos monoclonais para a PvRBP2b impede a entrada do parasito na célula hospedeira (Gruszczyk et al., 2018).

Diversos estudos têm mostrado que a imunogenicidade da AMA1 em indivíduos naturalmente infectados pelo *P. vivax* é alta, sendo confirmada pela detecção de anticorpos capazes de reconhecer seu ectodomínio (Múfalo et al., 2008; Pires et al., 2018; Rodrigues et al., 2005). Em um destes trabalhos, realizado durante 9 anos de seguimento no estado do Amazonas no Brasil, com instável transmissão da malária, foi mostrado que a detecção de anticorpos circulantes específicos para AMA1 pode servir como um marcador de recente exposição ao parasito (Pires et al., 2018). A resposta de anticorpos aumenta de acordo com o número de episódios de malária, chegando a uma frequência de 100% de respondedores à AMA1 no grupo de indivíduos com mais de três episódios (Rodrigues et al., 2005). Dentro de uma coorte de pacientes do Pará diagnosticados com malária vivax, o domínio DII foi o que mais mostrou ser imunogênico, para o qual pôde ser observada uma maior frequência de respondedores possuindo anticorpos IgG específicos e, além disso, epítomos relevantes podem estar presentes tanto no DI quanto no DII (Múfalo et al., 2008). Em animais, a imunização de camundongos com o ectodomínio da AMA1 (AMA1ect) recombinante foi capaz de ativar linfócitos Th1 e Th2, uma resposta que persistiu por um ano, além de induzir a produção de anticorpos capazes de reconhecer o antígeno AMA1 nativo de *P. vivax* (Salavatifar et al., 2015). Anticorpos obtidos de camundongos imunizados com PvAMA1ect também foram capazes de inibir a invasão de reticulócitos *in vitro* por diferentes isolados de *P. vivax* (Vicentin et al., 2014).

O polimorfismo da AMA1 é um importante detalhe que deve ser considerado no desenvolvimento de uma vacina que seja amplamente eficaz. Com a análise das sequências de isolados do *P. vivax*, coletados de diversas regiões do mundo, um grupo de pesquisadores reportou uma alta diversidade genética da PvAMA1 com considerável variação geográfica; detalhe que pode implicar na eficácia de uma futura

vacina nas diferentes áreas endêmicas (Arnott et al., 2013). Contudo, o sequenciamento de DNA do domínio variável da AMA1 de *P. vivax*, realizado a partir de isolados brasileiros, apresentou um limitado polimorfismo nesta região (Rodrigues et al., 2005). Ao analisar o impacto da diversidade genética da PvAMA1 sobre a resposta de anticorpos de pacientes infectados, um estudo utilizando duas variantes da proteína mostrou que as mesmas são altamente reativas, e que uma delas apresentou uma maior resposta entre os indivíduos moradores da região onde a linhagem correspondente circula (Bittencourt et al., 2020). Diante disso, para o desenvolvimento de vacinas baseadas em antígenos polimórficos, a frequência das linhagens presentes no local de estudo deve ser considerada (Bittencourt et al., 2020).

2.11.3 DBP

A descoberta da relação entre a ausência da glicoproteína Duffy nos eritrócitos com a proteção contra infecção pelo *P. vivax*, levou ao conhecimento da proteína de ligação ao antígeno Duffy (DBP), uma molécula de 135 a 140 kDa que, como o próprio nome diz, se liga ao antígeno Duffy, um receptor para quimiocinas (DARC, do inglês *duffy antigen receptor for chemokines*) presente na superfície dos eritrócitos (Wertheimer & Barnwell, 1989). Esta ligação da DBP pode ser inibida pela glicoproteína Duffy humana purificada e também pelo pré-tratamento dos eritrócitos com anticorpo monoclonal direcionado ao Duffy (Wertheimer & Barnwell, 1989). A DBP, expressa pelo *P. vivax* (PvDBP) e também pelo *P. knowlesi* (PkDBP), possui regiões homólogas às proteínas de ligação ao ácido siálico expressas pelo *P. falciparum*, o que inclui todas dentro de uma mesma família de antígenos de ligação ao eritrócito (EBA, do inglês *erythrocyte binding antigen*) (Adams et al., 1992). Os membros desta família EBA possuem domínio de ligação na região N-terminal, e um domínio C-terminal adjacente ao domínio transmembrana (Gaur et al., 2004). A porção extracelular destas proteínas pode ser dividida em seis regiões, sendo duas delas (região II e VI) ricas em cisteína altamente conservadas (Adams et al., 1992). A região II da DBP (DBPII) foi identificada como o domínio de ligação que possui os motivos necessários para a interação com o DARC, sendo muito importante na invasão dos eritrócitos (Chitnis & Miller, 1994). A DBPII contém 330 aminoácidos e, apesar dos resíduos de cisteína serem conservados, outros aminoácidos são altamente polimórficos, uma variação que não altera a função de ligação ao eritrócito, uma vez

que esta região é um ponto crítico de contato entre o parasito e a célula hospedeira, sendo sugerido que o alto polimorfismo surgiu para evitar a resposta imune (Xainli et al., 2000).

A DBP não é encontrada na superfície dos merozoítos, se localizando inicialmente nos micronemas (Adams et al., 1990), sendo liberada apenas após o contato do parasito com outros receptores presentes no eritrócito, que medeiam a adesão inicial e reorientação apical (Adams et al., 1992). Seu papel na formação da junção parece ser essencial pois ensaios *in vitro*, utilizando merozoítos de *P. knowlesi* e eritrócitos humanos negativos para Duffy, demonstraram que a interação inicial e reorientação apical ocorrem normalmente, mas sem o desenvolvimento da junção, o que impediu a invasão celular (Chitnis & Sharma, 2008). O mesmo foi observado quando o gene que codifica a DBP do *P. knowlesi* foi deletado, reforçando o papel chave da DBP, que também pode ser atribuído na invasão pelos merozoítos de *P. vivax* devido à sua homologia com a PkDBP (Chitnis & Sharma, 2008). Entretanto, a transmissão do *P. vivax* já foi observada em algumas populações Duffy negativas na África, um cenário sugestivo de que vias alternativas para a invasão do eritrócito podem estar sendo utilizadas, embora pareçam raras (Ryan et al., 2006; Zimmerman, 2017).

Anticorpos específicos para a DBP, naturalmente adquiridos pela infecção pelo *P. vivax*, foram detectados por diversos estudos (Barbedo et al., 2007; King et al., 2008; Nicolete et al., 2016). A frequência de respondedores para a DBP II é menor quando comparada com a MSP1-19 e a AMA1ect, mas quando analisada dentro de um grupo de indivíduos que sofreram múltiplas infecções maláricas, esta frequência aumenta (Barbedo et al., 2007). Além do reconhecimento da DBP II, ensaios *in vitro* mostraram que a longa exposição à malária induz a geração de anticorpos capazes de inibir a ligação de diferentes variantes da DBP II aos eritrócitos (Ceravolo et al., 2008). Um estudo realizado em crianças, que residem numa área de alta transmissão de malária na Papua Nova Guiné, mostrou que altos níveis de anticorpos inibidores da ligação estão associados com um reduzido risco de reinfecção pelo *P. vivax*, e com uma menor carga parasitária, quando comparadas com as crianças que possuem baixos níveis destes anticorpos circulantes (King et al., 2008). Nesta mesma coorte de crianças, também foi mostrado que a imunidade é específica de linhagem, pois os altos níveis de anticorpos bloqueadores específicos para uma variante da DBP II estão associados com um atraso no tempo da reinfecção pela mesma variante de *P. vivax*

(Cole-Tobian et al., 2009). A proteção contra subsequentes episódios de malária clínica também está associada com uma forte e persistente resposta de anticorpos inibidores da ligação da DBP-II ao DARC, como observado por um estudo realizado durante três anos de seguimento numa área de baixo nível de transmissão de *P. vivax* no Brasil (Nicolette et al., 2016). Anticorpos específicos para diferentes variantes da DBP-II podem persistir por até nove meses após a infecção pelo *P. vivax*, e que mesmo na ausência de reinfecção, a resposta de células B de memória específicas para estas variantes se mantém por no mínimo três anos (Changrob et al., 2018). Estes dados fornecem evidências de que a DBP-II possui capacidade de induzir resposta de células B de memória de longa duração mesmo em áreas com baixa transmissão de malária, como no caso deste estudo que foi realizado no sul da Tailândia (Changrob et al., 2018).

A capacidade dos anticorpos específicos para a DBP-II em bloquear a invasão dos reticulócitos pelo *P. vivax* foi demonstrada por diferentes métodos e grupos de pesquisa. Tanto anticorpos gerados a partir da imunização de coelhos com a DBP-II recombinante (Grimberg et al., 2007; Gupta et al., 2018), quanto anticorpos anti-DBP-II obtidos do plasma de indivíduos expostos à malária vivax (Grimberg et al., 2007), foram capazes de reduzir a invasão de reticulócitos pelo *P. vivax*. Para uma melhor compreensão sobre as características funcionais e específicas destes anticorpos protetores, amostras de indivíduos com alta atividade de bloqueio da ligação da DBP-II ao DARC foram utilizadas para a geração de anticorpos monoclonais, a partir do isolamento de células B de memória IgG⁺ e específicas para DBP-II. Estes anticorpos monoclonais foram capazes de inibir a entrada do *P. vivax* nos reticulócitos *in vitro*, e a ligação DBP-II-DARC, podendo estar reconhecendo o mesmo ou epítomos sobrepostos, como indicado pelos ensaios de competição (Carias et al., 2019). Anticorpos humanos adquiridos naturalmente também impediram a infecção dos reticulócitos por diferentes linhagens de *P. vivax*, via reconhecimento do local de ligação ao DARC (Carias et al., 2019; Urusova et al., 2019), que não é afetado pelo polimorfismo da DBP-II, sugerindo que os anticorpos evoluíram para cobrir múltiplas variantes deste antígeno pelo fato de terem como alvo os epítomos que são altamente conservados (Urusova et al., 2019). Todas estas observações dão suporte para o desenvolvimento de vacinas baseadas na DBP-II, que atualmente tem sido o maior foco para aquelas voltadas contra o estágio sanguíneo da infecção, com duas

candidatas tendo completado os testes de fase 1, como já abordado anteriormente no tópico de vacinas para *P. vivax*.

2.12 Mapeamento de epítomos

As respostas imunes adaptativas são específicas para antígenos, da qual fazem parte tanto a resposta imune humoral, mediada pelos anticorpos, quanto a resposta imune celular, mediada pelos linfócitos T (Sospedra et al., 2003). Um epítopo é uma parte de um antígeno que pode ser reconhecida pelas células B e T, via anticorpos, moléculas do MHC, receptores das células T, entre outros que fazem parte do sistema imune (Desai & Kulkarni-kale, 2014). Os anticorpos reconhecem principalmente determinantes conformacionais de moléculas complexas, presentes na sua forma solúvel ou particulada tanto no sangue como em outros fluidos corporais. Já as células T reconhecem epítomos lineares que podem variar entre 9 a 20 aminoácidos de comprimento e que estão ligados à fenda da molécula MHC (Sospedra et al., 2003). O MHC de classe I acomoda peptídeos curtos para serem apresentados aos linfócitos T CD8⁺, geralmente de 8 a 11 aminoácidos, e o MHC de classe II pode se ligar aos peptídeos mais longos, que variam de 13 a 17 aminoácidos e que são apresentados aos linfócitos T CD4⁺ (Desai & Kulkarni-kale, 2014). Como poucos aminoácidos que compreendem um epítopo são suficientes para induzir a resposta imune, a identificação ou predição dos epítomos de células B e T os possibilita de serem incluídos em vacinas de subunidades (Desai & Kulkarni-kale, 2014). Vacinas baseadas em peptídeos sintéticos possuem muitas vantagens, como: indução de um maior foco da resposta imune, segurança, estabilidade e custo reduzido (Gershoni et al., 2007).

Para o mapeamento de epítomos, diferentes métodos podem ser utilizados. A geração de uma biblioteca de peptídeos correspondente à sequência da região da proteína a ser estudada, seguida pela triagem experimental de todos estes peptídeos, é frequentemente utilizada para a identificação de epítomos de células T (Roederer & Koup, 2003; Sospedra et al., 2003). Uma outra alternativa é pelo uso de ferramentas de bioinformática, que possibilitam prever *in silico* quais epítomos têm alta possibilidade de serem imunogênicos com capacidade de se ligarem nas moléculas de MHC ou de serem reconhecidos por anticorpos (Jahangiri et al., 2019; Salimi et al.,

2010). Assim, peptídeos representando estes epítomos podem ser sintetizados e testados experimentalmente.

2.12.1 Identificação de epítomos de células B presentes na AMA1, DBP e MSP1

Um dos meios de se identificar um epítomo específico de células B é a partir da obtenção de um anticorpo monoclonal que se ligue a ele. Com a identificação deste anticorpo possuindo alta capacidade neutralizante, se propõe que ao imunizar indivíduos com o epítomo reconhecido por ele ocorrerá a indução da mesma resposta neutralizante característica do anticorpo original (Gershoni et al., 2007). Assim como este, outros métodos são utilizados para a identificação de epítomos de células B, algo que tem sido o objetivo de diversos estudos que buscam não somente entender o direcionamento da imunidade humoral, mas também o desenvolvimento de vacinas baseadas nos antígenos mais importantes capazes de induzir resposta de anticorpos que conferem proteção.

A maioria dos epítomos de células B não são lineares, mas sim conformacionais (Gershoni et al., 2007). Contudo, estudos mostraram que proteínas expressas pelo *Plasmodium* podem conter epítomos lineares reconhecidos por anticorpos de pacientes expostos à malária. Utilizando a ferramenta de predição de epítomos lineares para células B, um estudo conseguiu identificar 10 epítomos presentes na AMA1 de *P. vivax*, com provável ligação de alta afinidade, que podem potencialmente ser importantes para estudos de diagnóstico e vacinas (Jahangiri et al., 2019). Com base nesta mesma ferramenta de predição, outro trabalho mostrou a presença de um epítomo linear altamente antigênico no domínio II da PvAMA1, que conta com 18% e 33% da reatividade de IgG para PvAMA1ect e DII, respectivamente, como observado nos ensaios de depleção dos anticorpos específicos para o peptídeo sintético (Bueno et al., 2011).

Dentro da família das MSPs, a análise *in silico* e predição de epítomos presentes na MSP9 de *P. vivax* levou à identificação de um epítomo linear importante, presente dentro de uma região de repetição em tandem, com a resposta de IgG1 específica para o peptídeo sintético estando associada com os parâmetros epidemiológicos de proteção contra a malária (Rodrigues-Da-Silva et al., 2016). Epítomos presentes em dois blocos de repetição da MSP3 de *P. vivax* também foram mapeados a partir do reconhecimento de anticorpos adquiridos naturalmente pela infecção, confirmando a

alta imunogenicidade desta região (Lima-Junior et al., 2011). Em relação à MSP1, ensaios com os peptídeos que cobrem a proteína inteira de *P. vivax* mostraram que 14 sequências possuem capacidade de ligação específica aos reticulócitos, e que algumas delas estão localizadas próximas ao possível local de clivagem para a geração dos fragmentos de 42 e 19 kDa, sugerindo que estas sequências possuem papel importante no processo de adesão e invasão mediada pela MSP1 (Rodríguez et al., 2002).

Anticorpos inibitórios adquiridos naturalmente foram capazes de reconhecer epítomos lineares presentes na DBPII do *P. vivax*, em ensaios utilizando uma matriz de peptídeos correspondentes a este domínio da proteína (Chootong et al., 2010). Também foi observada a capacidade de inibição da ligação da DBPII ao eritrócito pelos anticorpos purificados específicos para os epítomos, o que confirma o papel de proteção da resposta imune gerada para regiões específicas da DBP (Chootong et al., 2010). Anticorpos monoclonais com capacidade de inibição reconhecem fortemente epítomos conservados presentes em variantes da PvDBP testadas *in vitro* (Ntumngia et al., 2012), e a partir do estudo de alguns destes anticorpos, epítomos inibitórios e amplamente conservados foram identificados, auxiliando na melhor compreensão sobre os alvos com potencial de conferir proteção, importantes para o desenvolvimento de uma vacina efetiva (Chen et al., 2016; George et al., 2019).

2.12.2 A importância dos epítomos específicos de células T CD4⁺

As células T CD4⁺ possuem seu grande papel em auxiliar os linfócitos B na produção de anticorpos de alta afinidade, com o objetivo de eliminar efetivamente o patógeno e proteger o indivíduo contra a doença. Diante disso, a busca sobre a resposta específica das células T CD4⁺ durante a infecção pelo *Plasmodium*, além de contribuir para o desenvolvimento de vacinas, nos ajuda a compreender melhor sobre seu papel na resposta imune desencadeada pelo parasito. Para identificar o antígeno específico apresentado num contexto de MHC classe II para a célula T CD4⁺, que seja capaz de induzir uma resposta com produção de citocinas, uma das ferramentas utilizadas é o mapeamento de epítomos presentes nas proteínas de interesse do estudo. A análise da resposta dos linfócitos T frente ao estímulo com antígenos tem sido realizada principalmente por ensaios de proliferação celular, avaliação da produção de IFN- γ , IL-10, como também de outras citocinas, que podem ser

detectadas pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*), que quantifica a concentração da citocina presente no sobrenadante da cultura, ou por ELISpot (do inglês, *enzyme-linked immunospot*), que fornece o número de células produtoras da citocina. Alguns trabalhos que se propuseram a investigar este assunto utilizaram em seus ensaios amostras humanas, para a obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*), ou fizeram análises em modelos animais.

As células T CD4⁺ são dependentes do processamento de antígenos eficiente realizado pelas células apresentadoras. Ao analisar a MSP1-19 de espécies murinas de *Plasmodium*, foi observado que as células apresentadoras de antígeno possuem dificuldade em processar esta proteína pelo fato deste fragmento da MSP1 possuir algumas ligações dissulfeto que impedem seu processamento, podendo afetar a geração de células Th que auxiliam na resposta das células B (Hensmann et al., 2004). Esta questão também foi observada com a MSP1-19 de *P. falciparum*, no qual as respostas de células T foram mais prevalentes para a proteína na forma reduzida e para seus peptídeos lineares do que para a proteína na forma nativa (Egan et al., 1997). Contudo, um estudo em camundongos mostrou que células T CD4⁺ podem proteger os animais da infecção letal por *P. chabaudi*, fornecendo uma eficiente ajuda para a resposta de anticorpos protetores específicos para a região C-terminal da MSP1, mesmo diante do fato destas células T reconhecerem um epítipo presente na outra região da proteína (Stephens et al., 2005). Em outro estudo, camundongos foram imunizados com anticorpos monoclonais direcionados para as células dendríticas, estando fusionados aos diferentes fragmentos da MSP1 de *P. vivax*. Os autores observaram que a geração de altos títulos de anticorpos anti-PvMSP1-19 foi dependente da resposta de células T CD4⁺ induzida por epítopos presentes na MSP1-33, mostrando a importância destes epítopos específicos para as células Th em auxiliar na resposta de anticorpo (Amorim et al., 2016).

2.12.3 Identificação de epítopos de células T presentes na AMA1, DBP e MSP1

Com o uso de amostras humanas, se torna possível realizar a identificação dos epítopos de células T imunodominantes e potencialmente importantes para a indução da resposta imune contra a infecção pelo *Plasmodium*. A identificação de epítopos presentes em diferentes regiões das três principais proteínas expressas pelos

merozoítos foi realizada por alguns grupos de pesquisa, que na sua maioria, a investigação teve como foco o *P. falciparum*.

Para um estudo envolvendo quenianos expostos à malária falciparum, nove peptídeos correspondentes à MSP1-33 foram sintetizados a partir da predição de epítomos, e mais oito peptídeos (com regiões sobrepostas), representando o bloco conservado da MSP1-19, foram também sintetizados e incluídos nos ensaios de proliferação celular utilizando PBMCs (Udhayakumar et al., 1995). Acima de 30% dos indivíduos responderam para seis peptídeos da MSP1-33, com os outros três peptídeos induzindo resposta proliferativa em menos de 25% da coorte. Somente três peptídeos presentes na MSP1-19 induziram proliferação em 30 a 37% dos indivíduos, com o restante induzindo resposta em 13 a 25% dos voluntários. De acordo com os resultados, a maioria dos epítomos imunodominantes de células T estão localizados em regiões conservadas ou dimórficas da proteína PfMSP1-42 (Udhayakumar et al., 1995). Outro trabalho utilizando amostras de pacientes da Gâmbia, expostos ao *P. falciparum*, mostrou que a MSP1-33 provavelmente possui epítomos específicos para linfócitos T (Egan et al., 1997). Nos ensaios de proliferação celular, foi observado que 94% dos pacientes responderam para a MSP1-42 recombinante e somente 26% tiveram resposta contra a MSP1-19, sugerindo que os epítomos imunodominantes estão presentes na MSP1-33 e em regiões conservadas da sequência. Além disso, nove peptídeos representando a MSP1-19 foram testados para resposta de proliferação, no qual as células de 7 dos 16 indivíduos (44%) testados reconheceram um ou mais peptídeos. Entretanto, a resposta de células T para a MSP1-19 recombinante ou para os peptídeos sintéticos, detectada em alguns indivíduos, não se correlacionou com a reatividade dos anticorpos para este fragmento da MSP1 (Egan et al., 1997).

Sobre a MSP1 de *P. vivax*, um estudo realizou primeiramente a identificação de peptídeos promíscuos para a ligação em quatro diferentes alelos do HLA-DRB1 utilizando uma biblioteca de 86 peptídeos, que cobrem toda a sequência da proteína MSP1, mas sem sobreposição de aminoácidos (cepa Belém, número de acesso GenBank M60807) (Caro-Aguilar et al., 2002). Vários peptídeos se ligaram em dois ou três tipos de HLA, sendo que oito foram capazes de se ligar nas quatro moléculas. Para determinar se estes oito peptídeos promíscuos são reconhecidos pelas células T de indivíduos com histórico de malária vivax, ensaios de proliferação celular foram realizados com amostras adquiridas de 33 voluntários moradores de uma região

endêmica para *P. vivax* na Colômbia, e como controle, 30 indivíduos saudáveis nunca expostos à malária. Os resultados mostraram que a frequência de respondedores para cada peptídeo no grupo exposto variou entre 18 a 48%, em contraste com o grupo não exposto que variou entre 3 a 23%, sendo então identificados 6 peptídeos que apresentaram diferença significativa na resposta entre os grupos analisados (Caro-Aguilar et al., 2002).

Para a proteína AMA1, encontramos um estudo no qual o mapeamento de epítomos foi realizado em amostras de indivíduos quenianos expostos ao *P. falciparum* (Lal et al., 1996). De acordo com a predição de epítomos de células T, 17 peptídeos foram sintetizados e utilizados em ensaios de proliferação celular, nos quais foram identificados 9 peptídeos que representam epítomos imunogênicos com capacidade de induzir resposta proliferativa nas amostras. A frequência de respondedores para cada um destes peptídeos variou de 12 a 25% do grupo testado. A reatividade para mais de um peptídeo foi observada na maioria dos respondedores, e aqueles epítomos que induziram forte resposta das células T estão localizados em regiões altamente conservadas da AMA1, o que sugere uma possível resposta de memória capaz de reconhecer diferentes variantes do parasito. A baixa frequência de respondedores para alguns peptídeos testados pode indicar epítomos fracos para células T ou que a resposta imune para os determinantes seja geneticamente restrita. Amostras do grupo controle, sem prévia exposição à malária, não apresentaram resposta aos peptídeos (Lal et al., 1996). Para a AMA1 de *P. vivax*, um trabalho utilizando diversas ferramentas de bioinformática avaliou diferentes aspectos da PvAMA1 em termos de estrutura, características físicas, químicas e biológicas (Jahangiri et al., 2019). Pela ferramenta de predição, este grupo foi capaz de identificar alguns epítomos de células T CD4⁺ e, com base em 10 alelos frequentes de HLA de classe II para cada um deles, foram escolhidos três peptídeos com alta afinidade. Diante das informações obtidas, a PvAMA1 contém epítomos potenciais e que podem ser utilizados como candidatos para as pesquisas que trabalham, principalmente, com o desenvolvimento de vacinas contra a malária (Jahangiri et al., 2019), colaborando com as investigações sobre o tipo de resposta imune induzida contra estes epítomos.

Com relação à DBP, encontramos um único estudo que teve como objetivo mapear os epítomos presentes na proteína utilizando amostras humanas. Em indivíduos expostos à malária vivax na Papua Nova Guiné, foi observado que a resposta imune celular para a proteína DBP é desenvolvida na maioria deles, sendo

detectada uma significativa produção de IFN- γ e IL-10 em 60 e 71%, respectivamente, da coorte estudada (Xainli et al., 2002). A intensidade da resposta foi associada com a idade, na qual crianças abaixo de cinco anos apresentaram reduzida produção das citocinas quando comparadas com as crianças mais velhas e com os adultos. Neste mesmo estudo, a triagem de 79 peptídeos referentes ao motivo de ligação ao DARC da DBPII foi realizada, utilizando também a detecção IFN- γ (por ELISpot) e IL-10 (por ELISA) em cada amostra. Cinco epítomos de células T imunodominantes foram identificados, com três deles contendo resíduos polimórficos que não reagiram cruzadamente em alguns indivíduos, sugestivo da possível ausência de exposição para uma determinada cepa do parasito, demonstrando que a resposta imune celular para a DBPII é linhagem-específica (Xainli et al., 2002).

2.12.4 O uso de biblioteca de peptídeos e matrizes otimizadas para o mapeamento de epítomos de células T

Pequenos peptídeos sobrepostos que abrangem uma proteína inteira podem ser utilizados para a determinação do número de células T reativas após o estímulo com os antígenos (Roederer & Koup, 2003). Para seu reconhecimento e indução da resposta celular, estes peptídeos devem ser apresentados ligados às moléculas de HLA, que exibem um alto grau de polimorfismo, uma variação que deve ser considerada quando se utiliza ferramentas de bioinformática para a predição de epítomos de células T (Desai & Kulkarni-kale, 2014). Uma das vantagens em utilizar a biblioteca de peptídeos é que o tipo de HLA do paciente não necessita ser determinado previamente (Roederer & Koup, 2003). Estas bibliotecas consideram todos os possíveis alelos de HLA presentes nos indivíduos, e a escolha do comprimento dos peptídeos a serem testados é fundamental para facilitar a ligação nas moléculas de MHC de classe I ou II (Anthony & Lehmann, 2003). Os antígenos solúveis adicionados nas culturas celulares são preferencialmente apresentados pelo MHC de classe II para a ativação de células T CD4⁺. Quando os peptídeos possuem um comprimento apropriado, eles podem se ligar diretamente nas moléculas de MHC presentes na superfície da célula apresentadora de antígeno (Anthony & Lehmann, 2003). A capacidade de estimular a resposta de células T CD4⁺ e T CD8⁺ pode ser diferente de acordo com o comprimento dos peptídeos, sendo um detalhe importante a ser considerado no momento da escolha. Peptídeos com 8 a 12 aminoácidos

induzem uma melhor resposta de células T CD8, já aqueles com 20 aminoácidos de comprimento são capazes de gerar resposta de células T CD4⁺, sendo muito menos eficientes na resposta de células T CD8⁺. Quando o objetivo é analisar a resposta de ambas as células, os peptídeos contendo 15 aminoácidos com uma sobreposição de 11 deles mostraram ser eficientes (Maecker et al., 2001).

Em experimentos que envolvem um grande número de peptídeos na biblioteca ou quando o número de células a serem testadas é limitado, utilizar uma combinação de peptídeos, conhecida como *pools*, num mesmo poço da placa de cultura, acaba sendo uma solução (Anthony & Lehmann, 2003). Com o objetivo de reduzir o número de ensaios e a quantidade de amostra clínica utilizada para o mapeamento de epítomos, Roederer e Koup criaram um software denominado “*Deconvolute-This*”, que testa todas as possíveis configurações dos *pools* de peptídeos de acordo com o número variável de potenciais positivos (Roederer & Koup, 2003). O agrupamento dos peptídeos no formato de uma matriz irá depender do número total de peptídeos, número desejado de peptídeos em cada *pool*, como também do número de vezes que cada peptídeo será repetido dentro da matriz (Roederer & Koup, 2003). O processo de mapeamento de epítomos de células T, utilizando as matrizes de *pools* de peptídeos otimizadas, reduz o número de testes necessários para a identificação dos epítomos, sendo rápido e eficiente, como já utilizado num estudo sobre HIV (Precopio et al., 2008). Assim, o mapeamento dos epítomos é realizado em duas etapas, onde primeiramente se faz a triagem dos *pools* e depois a testagem dos peptídeos individuais, presentes dentro dos *pools* que induziram a resposta celular e que foram considerados positivos (Roederer & Koup, 2003).

Para o mapeamento de epítomos de células T, a técnica de ELISpot é amplamente utilizada, principalmente pela sua alta sensibilidade em detectar células antígeno-específicas mesmo em baixas frequências, sendo mais sensível do que a técnica de citometria de fluxo. Para o ELISpot, os métodos de cultura costumam ser de curta duração, não mais de 24 horas, para evitar a proliferação e diferenciação das células T (Anthony & Lehmann, 2003). É com base nestas observações que para a realização de um dos principais objetivos da nossa pesquisa escolhemos utilizar biblioteca de peptídeos, no formato de uma matriz otimizada. Assim, para o mapeamento de epítomos específicos de células T presentes nas proteínas AMA1ect, DBPII e MSP1-42 do *P. vivax*, a técnica de ELISpot foi utilizada para a detecção de células produtoras de IFN- γ e IL-10, citocinas pró e anti-inflamatória, respectivamente.

2.13 Justificativa e hipóteses do estudo

Uma das maneiras de avaliar a resposta imune induzida por uma infecção é através da análise das alterações de populações celulares, presentes no sangue dos pacientes. Como as células T e B possuem papel importante no controle da infecção malárica, uma das propostas do projeto foi analisar se algumas subpopulações destas células estão alteradas durante a malária vivax aguda. Pelo fato de cada subpopulação ter um papel mais específico na resposta imune, essa investigação pode contribuir para uma melhor compreensão sobre a possível influência destas células no controle da infecção. Nossas hipóteses foram de que a infecção aguda pelo *P. vivax* induz um aumento das frequências de células Tfh e Treg, uma vez que estas alterações já foram encontradas por outros estudos realizados na Amazônia brasileira (Bueno et al., 2010; Costa et al., 2018; Figueiredo et al., 2017), uma região também escolhida para o nosso trabalho. Além dessas subpopulações de células T, nos propusemos a analisar as células Tfr, um subtipo de célula Treg nunca estudado em malária humana. As células Tfr atuam na regulação das respostas de células B e células Tfh nos centros germinativos. Diante disso, acreditamos que estas células também poderiam estar alteradas, com frequências elevadas no sangue dos pacientes com malária vivax aguda, uma vez que este tipo de infecção possui um caráter imunorregulatório. Do conjunto de células B, o maior foco da nossa investigação foi para a análise das células B de memória atípicas e de células Breg. Alguns estudos, realizados com amostras de indivíduos moradores de área endêmica de malária aqui no Brasil, já mostraram que a infecção aguda pelo *P. vivax* induz um aumento da frequência de células B de memória atípica (Figueiredo et al., 2017; Soares et al., 2019). Com esses dados, nossa hipótese também foi de que encontraríamos esta alteração na nossa população estudada. Por outro lado, sobre as células Breg, não encontramos nenhum estudo que tenha realizado a análise destas células durante a infecção malárica. Como estas células estão envolvidas na regulação da resposta imune, acreditamos que durante a infecção aguda da malária vivax ocorre um aumento da frequência destas células circulantes, principalmente daquelas produtoras de IL-10.

Dada a importância dos anticorpos no controle da infecção e proteção contra a malária, como também o papel fundamental das células T CD4⁺ em auxiliar a resposta imune humoral, a identificação de epítopos específicos para estas células auxilia no

desenvolvimento de novas vacinas, mas também na compreensão da resposta imune celular específica induzida durante a infecção pelo *Plasmodium*. Poucos estudos se propuseram a realizar este tipo de investigação, principalmente quando se trata do uso de bibliotecas de peptídeos que correspondem à proteína inteira de interesse. Nosso trabalho é o único que se propôs a realizar este tipo de mapeamento para identificar epítomos presentes em três importantes proteínas expressas por merozoítos do *P. vivax*, utilizando amostras de indivíduos brasileiros moradores da região amazônica. Não encontramos nenhum estudo que tivesse o objetivo de analisar esta resposta específica no mesmo indivíduo em fases diferentes da malária. Nossa investigação foi realizada em amostras de pacientes na fase aguda da infecção pelo *P. vivax* e na fase de convalescença, como também em indivíduos expostos não infectados moradores da mesma região, e em amostras de indivíduos controles não expostos à malária. Como já abordado anteriormente, epítomos presentes nas proteínas AMA1ect, DBPII e MSP1-42, foram identificados como imunogênicos em alguns estudos de indivíduos expostos à malária vivax e/ou falciparum. Como nenhum deles foi realizado em amostras brasileiras, a hipótese foi de que em nossa investigação, encontraríamos epítomos imunodominantes diferentes, principalmente devido ao polimorfismo do parasito como também das moléculas de HLA da população de estudo. Além disso, acreditamos na possibilidade de não apenas os grupos agudo e convalescente reconhecerem os peptídeos, mas também o grupo de indivíduos expostos, que podem manter células de memória específicas circulantes, geradas a partir das infecções prévias. A identificação destes peptídeos foi realizada a partir da detecção de células produtoras de IL-10, pelo fato de ser uma citocina anti-inflamatória muito característica presente no sangue dos pacientes com malária vivax aguda. E com o objetivo de avaliarmos uma possível resposta pró-inflamatória frente ao estímulo com os peptídeos, escolhemos analisar também o número de células produtoras de IFN- γ .

7 CONCLUSÃO

A infecção causada pelo *P. vivax* altera tanto a frequência quanto o número absoluto de diversas subpopulações de células T e B, mas que na fase convalescente, a maioria retorna para níveis normais. De acordo com nossos principais achados, concluímos que na fase aguda ocorre um aumento da frequência de células Treg e Tfr que expressam CTLA-4, de células Tfh com perfil Th1 e de células B de memória atípica, que podem contribuir com uma resposta imune capaz de controlar a doença, mas não de impedir novas infecções. Como estas células B atípicas estão associadas com a produção de anticorpos de baixa afinidade, essa resposta pode não ser eficiente para a proteção contra a infecção, sendo uma das causas dos episódios recorrentes de malária. Os altos títulos de anticorpos anti-AMA1ect e anti-MSP1-19, encontrados na fase aguda, indicam alta atividade nos centros germinativos dos órgãos linfoides secundários, onde as células Tfr CTLA-4⁺ podem estar sendo geradas para o controle dessa atividade, ocasionando um aumento das suas frequências na circulação periférica. A expansão das células T reguladoras, juntamente com a das células B produtoras de IL-10 na fase aguda, pode contribuir com a imunorregulação da resposta imune, protegendo o indivíduo contra a forma grave da malária. Sobre o mapeamento de peptídeos, concluímos que a resposta específica das células T CD4⁺ contra peptídeos de três proteínas do *P. vivax* (AMA1ect, DBPII e MSP1-42), observada durante a fase aguda da infecção, tem um perfil voltado para uma resposta anti-inflamatória, que não é mantida durante a fase convalescente. Apenas dois peptídeos mostraram ser mais amplamente reconhecidos durante a malária aguda, com capacidade de induzir a produção de IL-10, estando um presente na proteína DBPII e o outro na porção de 33 kDa da MSP1-42.

Como conclusões pontuais, temos que:

1. Uma alta resposta de anticorpos IgG anti-AMA1ect e anti-MSP1-19 foi encontrada no grupo de pacientes com malária vivax aguda em relação aos controles expostos, que foi mantida na fase convalescente.
2. A infecção pelo *P. vivax* induz um aumento relativo da população de células Tfh circulantes, que se correlacionam negativamente com a idade do paciente e positivamente com a parasitemia. Dentro deste compartimento celular ocorre um

aumento da proporção de células Tfh com perfil Th1 e Th2, e uma diminuição das células Tfh com perfil Th17, durante a fase aguda.

3. Um aumento da frequência de células Treg e Tfr positivas para CTLA-4, assim como dos níveis de expressão desta molécula imunossupressora, é encontrado durante a infecção aguda causada pelo *P. vivax*. A expressão de CTLA-4 nas células Treg correlaciona-se positivamente com a carga parasitária.

4. Células B de memória atípica estão em maiores proporções durante a infecção aguda pelo *P. vivax*, sendo mantidas na fase convalescente. Já as células Breg com o fenótipo CD24^{hi}CD27⁺ estão em menores proporções durante a fase aguda da infecção, e aquelas caracterizadas como Breg CD24^{hi}CD38^{hi} não são afetadas pela doença. A expressão de CD39 na maioria das subpopulações de células B é afetada negativamente pela infecção causada por *P. vivax*, sendo as células Breg CD24^{hi}CD38^{hi} as que possuem menores frequências de células CD39⁺, tendo uma baixa expressão desta molécula imunossupressora.

5. Sob estímulo em cultura com LPS e PMA/ION uma maior frequência de células Breg CD24^{hi}CD27⁺ e CD24^{hi}CD38^{hi}, células B de memória e plasmócitos/plasmablastos produtoras de IL-10 é encontrada nas amostras de PBMCs obtidas dos pacientes na fase aguda da infecção pelo *P. vivax* em comparação à fase convalescente. Mais de 90% destas células IL-10⁺ são também CD39⁺, com exceção das células Breg CD24^{hi}CD38^{hi} a qual a maioria é capaz de produzir a citocina na ausência da expressão de CD39 nas amostras do grupo com malária aguda.

6. Os dois peptídeos mais amplamente reconhecidos, que induziram resposta celular com produção de IL-10 durante a fase aguda da infecção pelo *P. vivax*, foram o peptídeo 7 (RYNKDFCKDIRWSLGDFGDI) da DBPII e o peptídeo 18 (KTHLTAVNEEVKKVEADIK) da MSP1-33. A maioria dos peptídeos possuiu uma baixa frequência de respondedores em todos os grupos de indivíduos estudados. O perfil de resposta mais prevalente foi de produção de IL-10 nas amostras do grupo agudo e de produção de IFN- γ nas amostras do grupo exposto. A resposta específica encontrada na fase aguda não é mantida na fase convalescente na qual, em alguns casos, peptídeos diferentes induziram a produção de uma das citocinas.

Nossas perspectivas são de que uma análise da resposta imune específica para os dois peptídeos identificados em nosso estudo, utilizando um maior número de amostras de pacientes, poderá confirmar a capacidade imunogênica dos mesmos.

Estudos com o objetivo de avaliar a relação da resposta imune específica, gerada nos pacientes com malária na fase aguda, com o grau de proteção contra a doença clínica, como também a análise de correlação sobre a resposta gerada em indivíduos expostos com a proteção contra a infecção pelo *P. vivax*, irão contribuir para um melhor esclarecimento sobre a importância da geração da resposta imune celular específica nestes indivíduos. Uma investigação sobre o perfil de resposta específica induzido em infecções assintomáticas, poderá esclarecer qual é o tipo de resposta atribuído à imunidade clínica, e quais são os epítomos importantes para conferir esta proteção, com grandes chances de serem candidatos vacinais.

Sobre o estudo das subpopulações de células T e B circulantes, algo interessante seria investigar se as células Tfh com perfil Th1 influenciam na diferenciação das células B de memória atípicas, utilizando ensaios funcionais. A análise da capacidade reguladora das células Tfr e dos dois subtipos de células Breg, assim como um estudo sobre a qualidade dos anticorpos produzidos pelas células B de memória atípica, irão auxiliar no melhor entendimento sobre o papel destas células no controle da infecção malárica. Além disso, uma comparação das respostas e funções das células Breg que expressam ou não CD39, uma molécula que contribui para a imunossupressão, irá desvendar sua influência e importância durante a infecção pelo *P. vivax*, algo nunca estudado até o momento.

REFERÊNCIAS¹

- Adams, J. H., Sim, B. K. L., Dolan, S. A., Fang, X., Kaslow, D. C., & Miller, L. H. (1992). A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(15), 7085–7089. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.15.7085>
- Adams, John H., Hudson, D. E., Torii, M., Ward, G. E., Wellems, T. E., Aikawa, M., & Miller, L. H. (1990). The duffy receptor family of plasmodium knowlesi is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell*, 63(1), 141–153. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90295-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90295-P)
- Agarwal, A., Guindo, A., Cissoko, Y., Taylor, J. G., Coulibaly, D., Kone, A., Kayentao, K., Djimde, A., Plowe, C. V., Doumbo, O., Wellems, T. E., & Diallo, D. (2000). Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood*, 96(7), 2358–2363. https://doi.org/10.1182/blood.v96.7.2358.h8002358_2358_2363
- Aitken, E. H., Alemu, A., & Rogerson, S. J. (2018). Neutrophils and Malaria. *Frontiers in Immunology*, 9(December), 3005. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03005>
- Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C., & Stagg, J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological Reviews*, 276(1), 121–144. <https://doi.org/10.1111/imr.12528>
- Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., & Ménard, R. (2006). Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*, 12(2), 220–224. <https://doi.org/10.1038/nm1350>
- Amorim, K. N. S., Rampazo, E. V., Antonialli, R., Yamamoto, M. M., Rodrigues, M. M., Soares, I. S., & Boscardin, S. B. (2016). The presence of T cell epitopes is important for induction of antibody responses against antigens directed to DEC205+ dendritic cells. *Scientific Reports*, 6(December), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep39250>
- Andrade, B. B., Reis-Filho, A., Souza-Neto, S. M., Clarncio, J., Camargo, L. M., Barral, A., & Barral-Netto, M. (2010). Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria Journal*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-13>
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., & Romagnani, S. (2015). Human T helper type 1 dichotomy: origin, phenotype and biological activities. *Immunology*, 144(3), 343–351. <https://doi.org/10.1111/imm.12399>
- Anstey, N. M., Douglas, N. M., Poespoprodjo, J. R., & Price, R. N. (2012). Plasmodium vivax: Clinical Spectrum, Risk Factors and Pathogenesis. In *Advances in Parasitology* (Vol. 80). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397900-1.00003-7>
- Anthony, D. D., & Lehmann, P. V. (2003). T-cell epitope mapping using the ELISPOT approach. *Methods*, 29(3), 260–269. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00348-1](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00348-1)
- Antonelli, L. R., Junqueira, C., Vinetz, J. M., Golenbock, D. T., Ferreira, M. U., & Gazzinelli, R. T. (2020). The immunology of Plasmodium vivax malaria. *Immunological Reviews*, 293(1), 163–189. <https://doi.org/10.1111/imr.12816>

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- Arévalo-Pinzón, G., Bermúdez, M., Hernández, D., Curtidor, H., & Patarroyo, M. A. (2017). Plasmodium vivax ligand-receptor interaction: PvAMA-1 domain i contains the minimal regions for specific interaction with CD71+ reticulocytes. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10025-6>
- Arnott, A., Mueller, I., Ramsland, P. A., Siba, P. M., Reeder, J. C., & Barry, A. E. (2013). Global Population Structure of the Genes Encoding the Malaria Vaccine Candidate, Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA1). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10), e2506. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002506>
- Arrow, K. J., Panosian, C., & Gelband, H. (2004). Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance. In *Institute of Medicine (US) Committee on the Economics of Antimalarial Drugs*. <http://www.nap.edu/catalog/11017.html>
- Baird, J. K. (2004). Chloroquine Resistance in Plasmodium vivax. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11), 4075–4083. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4075>
- Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Dluzewski, A. R., Margos, G., Williams, I. T., Blackman, M. J., Kocken, C. H., Thomas, A. W., & Mitchell, G. H. (2003). Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 (PfAMA-1) is translocated within micronemes along subpellicular microtubules during merozoite development. *Journal of Cell Science*, 116(18), 3825–3834. <https://doi.org/10.1242/jcs.00665>
- Barbedo, M. B., Ricci, R., Jimenez, M. C. S., Cunha, M. G., Yazdani, S. S., Chitnis, C. E., Rodrigues, M. M., & Soares, I. S. (2007). Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of Plasmodium vivax. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(3), 335–339. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000040>
- Basu, S., & Sahi, P. K. (2017). Malaria: An Update. *Indian Journal of Pediatrics*, 84(7), 521–528. <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2332-2>
- 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., ... Gething, P. W. (2019). Mapping the global endemicity and clinical burden of Plasmodium vivax, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. *The Lancet*, 394(10195), 332–343. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31096-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31096-7)
- Bayoumi, R. A. (1987). The sickle-cell trait modifies the intensity and specificity of the immune response against P. falciparum malaria and leads to acquired protective immunity. *Medical Hypotheses*, 22(3), 287–298. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(87\)90193-9](https://doi.org/10.1016/0306-9877(87)90193-9)
- Beeson, J. G., Osier, F. H. A., & Engwerda, C. R. (2008). Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. *Trends in Parasitology*, 24(12), 578–584. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.08.008>
- Bentebibel, S. E., Lopez, S., Obermoser, G., Schmitt, N., Mueller, C., Harrod, C., Flano, E., Mejias, A., Albrecht, R. A., Blankenship, D., Xu, H., Pascual, V., Banchereau, J., Garcia-Sastre, A., Palucka, A. K., Ramilo, O., & Ueno, H. (2013). Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Science Translational Medicine*, 5(176), 1–11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005191>
- Bittencourt, N. C., da Silva, A. B. I. E., Virgili, N. S., Schappo, A. P., Gervásio, J. H. D. B., Pimenta, T. S., Kujbida Junior, M. A., Ventura, A. M. R. S., Libonati, R. M. F., Silva-Filho, J. L., Dos Santos, H. G., Lopes, S. C. P., Lacerda, M. V. G., Machado, R. L. D., Costa, F.

- T. M., & Albrecht, L. (2020). Plasmodium vivax ama1: Implications of distinct haplotypes for immune response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *14*(7), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008471>
- Blackman, M J, Heidrich, H. G., Donachie, S., McBride, J. S., & Holder, A. A. (1990). A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *Journal of Experimental Medicine*, *172*(1), 379–382. <https://doi.org/10.1084/jem.172.1.379>
- Blackman, Michael J., Whittle, H., & Holder, A. A. (1991). Processing of the Plasmodium falciparum major merozoite surface protein-1: identification of a 33-kilodalton secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *49*(1), 35–44. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90128-S](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90128-S)
- Blair, P. A., Noreña, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R., & Mauri, C. (2010). CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*, *32*(1), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>
- Bowyer, G., Grobbelaar, A., Rampling, T., Venkatraman, N., Morelle, D., Ballou, R. W., Hill, A. V. S., & Ewer, K. J. (2018). CXCR3+ T follicular helper cells induced by co-administration of RTS, S/AS01B and viral-vectored vaccines are associated with reduced immunogenicity and efficacy against malaria. *Frontiers in Immunology*, *9*(JUL), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01660>
- Brahimi, K., Martins, Y. C., Zanini, G. M., Ferreira-da-Cruz, M. de F., & Daniel-Ribeiro, C. T. (2011). Monoclonal auto-antibodies and sera of autoimmune patients react with Plasmodium falciparum and inhibit its in vitro growth. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *106*(SUPPL. 1), 44–51. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000900006>
- Bueno, L. L., Lobo, F. P., Morais, C. G., Mourão, L. C., de Ávila, R. A. M., Soares, I. S., Fontes, C. J., Lacerda, M. V., Olórtegui, C. C., Bartholomeu, D. C., Fujiwara, R. T., & Braga, É. M. (2011). Identification of a Highly Antigenic Linear B Cell Epitope within Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1). *PLoS ONE*, *6*(6), e21289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021289>
- Bueno, L. L., Morais, C. G., Araújo, F. F., Gomes, J. A. S., Corrêa-Oliveira, R., Soares, I. S., Lacerda, M. V., Fujiwara, R. T., & Braga, É. M. (2010). Plasmodium vivax: Induction of CD4+CD25+FoxP3 + regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS ONE*, *5*(3), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009623>
- Cappadoro, B. M., Giribaldi, G., Brien, E. O., Turrini, F., Mannu, F., Ulliers, D., Simula, G., Luzzatto, L., & Arese, P. (1998). Early Phagocytosis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)-Deficient Erythrocytes Parasitized by Plasmodium falciparum May Explain Malaria Protection in G6PD Deficiency. *Blood*, *92*(7), 2527–2534.
- Carias, L. L., Dechavanne, S., Nicolete, V. C., Sreng, S., Suon, S., Amaratunga, C., Fairhurst, R. M., Dechavanne, C., Barnes, S., Witkowski, B., Popovici, J., Roesch, C., Chen, E., Ferreira, M. U., Tolia, N. H., Adams, J. H., & King, C. L. (2019). Identification and Characterization of Functional Human Monoclonal Antibodies to Plasmodium vivax Duffy-Binding Protein. *The Journal of Immunology*, *202*(9), 2648–2660. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801631>
- Caro-Aguilar, I., Rodríguez, A., Calvo-Calle, J. M., Guzmán, F., De la Vega, P., Patarroyo, M. E., Galinski, M. R., & Moreno, A. (2002). Plasmodium vivax promiscuous T-helper epitopes defined and evaluated as linear peptide chimera immunogens. *Infection and*

- Immunity*, 70(7), 3479–3492. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3479-3492.2002>
- Carter, R. (2003). Speculations on the origins of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends in Parasitology*, 19(5), 214–219. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00070-9)
- Carter, R., & Mendis, K. N. (2002). Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 564–594. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.564-594.2002>
- Carvalho, B. O., Lopes, S. C. P., Nogueira, P. A., Orlandi, P. P., Bargieri, D. Y., Blanco, Y. C., Mamoni, R., Leite, J. A., Rodrigues, M. M., Soares, I. S., Oliveira, T. R., Wunderlich, G., Lacerda, M. V. G., Del Portillo, H. A., Araújo, M. O. G., Russell, B., Suwanarusk, R., Snounou, G., Rénia, L., & Costa, F. T. M. (2010). On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. *Journal of Infectious Diseases*, 202(4), 638–647. <https://doi.org/10.1086/654815>
- Castro, M. C. (2017). Malaria transmission and prospects for malaria eradication: The role of the environment. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(10), 1–12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025601>
- Cavasini, C. E., Mattos, L. C., Couto, A. A. D., Bonini-Domingos, C. R., Valencia, S. H., Neiras, W. C. de S., Alves, R. T., Rossit, A. R. B., Castilho, L., & Machado, R. L. D. (2007). *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(10), 1042–1044. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.04.011>
- Ceravolo, I. P., Souza-Silva, F. A., Fontes, C. J. F., Braga, E. M., Madureira, A. P., Krettli, A. U., Souza, J. M., Brito, C. F. A., Adams, J. H., & Carvalho, L. H. (2008). Inhibitory properties of the antibody response to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein in an area with unstable malaria transmission. *Scandinavian Journal of Immunology*, 67(3), 270–278. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.02059.x>
- Changrob, S., Leepiyasakulchai, C., Tsuboi, T., Cheng, Y., Lim, C. S., Chootong, P., & Han, E. T. (2015). Naturally-acquired cellular immune response against *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 paralog antigen. *Malaria Journal*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0681-8>
- Changrob, S., McHenry, A. M., Nyunt, M. H., Sattabongkot, J., Han, E. T., Adams, J. H., & Chootong, P. (2018). Persistence of Long-lived Memory B Cells specific to Duffy Binding Protein in individuals exposed to *Plasmodium vivax*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26677-x>
- Chaves, Y. O., Da Costa, A. G., Pereira, M. L. M., De Lacerda, M. V. G., Coelho-Dos-Reis, J. G., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Malheiro, A., Monteiro, W. M., Orlandi, P. P., Marinho, C. R. F., & Nogueira, P. A. (2016). Immune response pattern in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria Journal*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1501-5>
- Chen, E., Salinas, N. D., Huang, Y., Ntumngia, F., Plasencia, M. D., Gross, M. L., Adams, J. H., & Tolia, N. H. (2016). Broadly neutralizing epitopes in the *Plasmodium vivax* vaccine candidate Duffy Binding Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(22), 6277–6282. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600488113>
- Chen, J. H., Chen, S. B., Wang, Y., Ju, C., Zhang, T., Xu, B., Shen, H. M., Mo, X. J., Molina, D. M., Eng, M., Liang, X., Gardner, M. J., Wang, R., & Hu, W. (2015). An immunomics approach for the analysis of natural antibody responses to *Plasmodium vivax* infection. *Molecular BioSystems*, 11(8), 2354–2363. <https://doi.org/10.1039/c5mb00330j>

- Chen, J. H., Wang, Y., Ha, K. S., Lu, F., Suh, I. B., Lim, C. S., Park, J. H., Takeo, S., Tsuboi, T., & Han, E. T. (2011). Measurement of naturally acquired humoral immune responses against the C-terminal region of the Plasmodium vivax MSP1 protein using protein arrays. *Parasitology Research*, 109(5), 1259–1266. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2370-z>
- Chen, Xiaojun, Li, W., Zhang, Y., Song, X., Xu, L., Xu, Z., Zhou, S., Zhu, J., Jin, X., Liu, F., Chen, G., & Su, C. (2015). Distribution of peripheral memory t follicular helper cells in patients with schistosomiasis japonica. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004015>
- Chen, Xin, & Oppenheim, J. J. (2010). TNF-alpha: an activator of CD4+FoxP3+TNFR2+ regulatory T cells. *Curr Dir Autoimmun*, 11(1), 119–134. <https://doi.org/10.1159/000289201>
- Cheng, Y., Wang, Y., Ito, D., Kong, D. H., Ha, K. S., Chen, J. H., Lu, F., Li, J., Wang, B., Takashim, E., Sattabongkot, J., Tsuboi, T., & Han, E. T. (2013). The plasmodium vivax merozoite surface protein 1 paralog is a novel erythrocyte-binding ligand of p. vivax. *Infection and Immunity*, 81(5), 1585–1595. <https://doi.org/10.1128/IAI.01117-12>
- Chesne-Seck, M. L., Pizarro, J. C., Vulliez-Le Normand, B., Collins, C. R., Blackman, M. J., Faber, B. W., Remarque, E. J., Kocken, C. H. M., Thomas, A. W., & Bentley, G. A. (2005). Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 144(1), 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.07.007>
- Chitnis, C. E., & Miller, L. H. (1994). Identification of the erythrocyte binding domains of Plasmodium vivax and Plasmodium knowlesi proteins involved in erythrocyte invasion. *The Journal of Experimental Medicine*, 180(2), 497–506. <https://doi.org/10.1084/jem.180.2.497>
- Chitnis, C. E., & Sharma, A. (2008). Targeting the Plasmodium vivax Duffy-binding protein. *Trends in Parasitology*, 24(1), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.10.004>
- Chootong, P., Ntumngia, F. B., VanBuskirk, K. M., Xainli, J., Cole-Tobian, J. L., Campbell, C. O., Fraser, T. S., King, C. L., & Adams, J. H. (2010). Mapping epitopes of the Plasmodium vivax Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. *Infection and Immunity*, 78(3), 1089–1095. <https://doi.org/10.1128/IAI.01036-09>
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., Pattanapanyasat, K., Chierakul, W., Simpson, J., Looareesuwan, S., & White, N. (2002). Hemoglobin E: A balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe P falciparum malaria. *Blood*, 100(4), 1172–1176. https://doi.org/10.1182/blood.v100.4.1172.h81602001172_1172_1176
- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., Suwanarusk, R., Pukrittayakamee, S., Wilairatana, P., Beeson, J. G., Day, N. P. J., & White, N. J. (2012). Plasmodium vivax adherence to placental glycosaminoglycans. *PLoS ONE*, 7(4), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034509>
- Cole-Tobian, J. L., Michon, P., Biasor, M., Richards, J. S., Beeson, J. G., Mueller, I., & King, C. L. (2009). Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous Plasmodium vivax strains in Papua New Guinean children. *Infection and Immunity*, 77(9), 4009–4017. <https://doi.org/10.1128/IAI.00158-09>
- Costa, P. A. C., Figueiredo, M. M., Diniz, S. Q., Peixoto, A. P. M. M., Maloy, K. J., Teixeira-Carvalho, A., Tada, M. S., Pereira, D. B., Gazzinelli, R. T., & Antonelli, L. R. V. (2018). Plasmodium vivax infection impairs regulatory T-Cell suppressive function during acute

- malaria. *Journal of Infectious Diseases*, 218(8), 1314–1323. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy296>
- Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124(4), 755–766. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.006>
- Cowman, A. F., Tonkin, C. J., Tham, W. H., & Duraisingh, M. T. (2017). The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host and Microbe*, 22(2), 232–245. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.003>
- Cox-Singh, J., Davis, T. M. E., Lee, K.-S., Shamsul, S. S. G., Matusop, A., Ratnam, S., Rahman, H. A., Conway, D. J., & Singh, B. (2008). Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life-threatening. *Clin Infect Dis*, 46(2), 165–171. <https://doi.org/10.1086/524888.Plasmodium>
- Cox, F. E. (2010). History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites and Vectors*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-5>
- Crotty, S. (2014). T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity*, 41(4), 529–542. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.004>
- Cunha, C. B., & Cunha, B. A. (2008). Brief history of the clinical diagnosis of malaria: From hippocrates to Osler. *Journal of Vector Borne Diseases*, 45(3), 194–199.
- Cunha, M. G., Rodrigues, M. M., & Soares, I. S. (2002). Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the Plasmodium vivax vaccine candidate MSP119 expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine*, 20(3–4), 385–396. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00359-0](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00359-0)
- Currier, J., Sattabongkot, J., & Good, M. F. (1992). “Natural” T cells responsive to malaria: Evidence implicating immunological cross-reactivity in the maintenance of TCR $\alpha\beta$ + malaria-specific responses from non-exposed donors. *International Immunology*, 4(9), 985–994. <https://doi.org/10.1093/intimm/4.9.985>
- Daron, J., Boissière, A., Boundenga, L., Ngoubangoye, B., Houze, S., Arnathau, C., Sidobre, C., Trape, J. F., Durand, P., Renaud, F., Fontaine, M. C., Prugnolle, F., & Rougeron, V. (2021). Population genomic evidence of Plasmodium vivax Southeast Asian origin. *Science Advances*, 7(18). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc3713>
- Dayanand, K. K., Achur, R. N., & Gowda, D. C. (2018). Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of plasmodium vivax malaria. *Journal of Vector Borne Diseases*, 55(1), 1–8. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.234620>
- del Portillo, H. A., Gysin, J., Mattei, D. M., Khouri, E., Udagama, P. V., Mendis, K. N., & David, P. H. (1988). Plasmodium vivax: Cloning and expression of a major blood-stage surface antigen. *Experimental Parasitology*, 67(2), 346–353. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(88\)90081-1](https://doi.org/10.1016/0014-4894(88)90081-1)
- Deloron, P., & Chougnet, C. (1992). Is Immunity to malaria really short-lived? *Parasitology Today*, 8(11), 375–378. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(92\)90174-Z](https://doi.org/10.1016/0169-4758(92)90174-Z)
- Deroost, K., Pham, T. T., Opdenakker, G., & Van den Steen, P. E. (2016). The immunological balance between host and parasite in malaria. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 40, Issue 2). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv046>
- Desai, D. V., & Kulkarni-kale, U. (2014). T-cell epitope prediction methods: an overview. *Methods in Molecular Biology*, 1184, 333–364. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8_19

- Dhaeze, T., Peelen, E., Hombrouck, A., Peeters, L., Van Wijmeersch, B., Lemkens, N., Lemkens, P., Somers, V., Lucas, S., Broux, B., Stinissen, P., & Hellings, N. (2015). Circulating Follicular Regulatory T Cells Are Defective in Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*, *195*(3), 832–840. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500759>
- Dinzouna-Boutamba, S. D., Lee, S., Son, U. H., Song, S. M., Yun, H. S., Joo, S. Y., Kwak, D., Rhee, M. H., Chung, D. I., Hong, Y., & Goo, Y. K. (2016). Distribution of Antibodies Specific to the 19-kDa and 33-kDa Fragments of Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein 1 in Two Pathogenic Strains Infecting Korean Vivax Malaria Patients. *Osong Public Health and Research Perspectives*, *7*(4), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2016.05.006>
- Draper, S. J., Sack, B. K., King, C. R., Nielsen, C. M., Rayner, J. C., Higgins, M. K., Long, C. A., & Seder, R. A. (2018). Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell Host and Microbe*, *24*(1), 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.008>
- Duffy, P. E., & Patrick Gorres, J. (2020). Malaria vaccines since 2000: progress, priorities, products. *Npj Vaccines*, *5*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0196-3>
- Dvorak, J., Miller, L., Whitehouse, W., & Shiroishi, T. (1975). Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science*, *187*(4178), 748–750. <https://doi.org/10.1126/science.803712>
- Egan, A., Waterfall, M., Pinder, M., Holder, A., & Riley, E. (1997). Characterization of human T- and B-cell epitopes in the C terminus of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1: Evidence for poor T-cell recognition of polypeptides with numerous disulfide bonds. *Infection and Immunity*, *65*(8), 3024–3031. <https://doi.org/10.1128/iai.65.8.3024-3031.1997>
- Fang, Q., Deng, Y., Liang, R., Mei, Y., Hu, Z., Wang, J., Sun, J., Zhang, X., Bellanti, J. A., & Zheng, S. G. (2020). CD19+CD24hiCD38hi regulatory B cells: A potential immune predictive marker of severity and therapeutic responsiveness of hepatitis C. *American Journal of Translational Research*, *12*(3), 889–900.
- Fernandez-Becerra, C., Sanz, S., Brucet, M., Stanisic, D. I., Alves, F. P., Camargo, E. P., Alonso, P. L., Mueller, I., & Del Portillo, H. A. (2010). Naturally-acquired humoral immune responses against the N- and C-termini of the Plasmodium vivax MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay. *Malaria Journal*, *9*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-29>
- Ferreira, M. U., & Castro, M. C. (2016). Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malaria Journal*, *15*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1335-1>
- Figueiredo, M. M., Costa, P. A. C., Diniz, S. Q., Henriques, P. M., Kano, F. S., Tada, M. S., Pereira, D. B., Soares, I. S., Martins-Filho, O. A., Jankovic, D., Gazzinelli, R. T., & Antonelli, L. R. do V. (2017). T follicular helper cells regulate the activation of B lymphocytes and antibody production during Plasmodium vivax infection. *PLoS Pathogens*, *13*(7), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006484>
- Figueiró, F., Muller, L., Funk, S., Jackson, E. K., Battastini, A. M. O., & Whiteside, T. L. (2016). Phenotypic and functional characteristics of CD39high human regulatory B cells (Breg). *Oncotmunology*, *5*(2). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1082703>
- Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M. R., Isenberg, D. A., & Mauri, C. (2013). CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Science Translational Medicine*, *5*(173). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005407>

- Fonseca, V. R., Agua-Doce, A., Maceiras, A. R., Pierson, W., Ribeiro, F., Romão, V. C., Pires, A. R., Silva, S. L. da, Fonseca, J. E., Sousa, A. E., Linterman, M. A., & Graca, L. (2017). Human blood Tfr cells are indicators of ongoing humoral activity not fully licensed with suppressive function. *Science Immunology*, 2(14), 1–13. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan1487>
- Frimpong, A., Kusi, K. A., Ofori, M. F., & Ndifon, W. (2018). Novel strategies for malaria vaccine design. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02769>
- Gaur, D., Mayer, D. C. G., & Miller, L. H. (2004). Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by Plasmodium merozoites. *International Journal for Parasitology*, 34(13–14), 1413–1429. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.010>
- Gazzinelli, R. T., Kalantari, P., Fitzgerald, K. A., & Golenbock, D. T. (2014). Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews Immunology*, 14(11), 744–757. <https://doi.org/10.1038/nri3742>
- George, M. T., Schloegel, J. L., Ntumngia, F. B., Barnes, S. J., King, C. L., Casey, J. L., Foley, M., & Adams, J. H. (2019). Identification of an Immunogenic Broadly Inhibitory Surface Epitope of the Plasmodium vivax Duffy Binding Protein Ligand Domain. *MSphere*, 4(3), 1–14. <https://doi.org/10.1128/msphere.00194-19>
- Gershoni, J. M., Roitburd-Berman, A., Siman-Tov, D. D., Tarnovitski Freund, N., & Weiss, Y. (2007). Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines. *BioDrugs*, 21(3), 145–156. <https://doi.org/10.2165/00063030-200721030-00002>
- Gimenez, A. M., Salman, A. M., Marques, R. F., López-Camacho, C., Harrison, K., Kim, Y. C., Janse, C. J., Soares, I. S., & Reyes-Sandoval, A. (2021). A universal vaccine candidate against Plasmodium vivax malaria confers protective immunity against the three PvCSP alleles. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96986-1>
- Gonçalves-Lopes, R. M., Lima, N. F., Carvalho, K. I., Scopel, K. K. G., Kallás, E. G., & Ferreira, M. U. (2016). Surface expression of inhibitory (CTLA-4) and stimulatory (OX40) receptors by CD4+ regulatory T cell subsets circulating in human malaria. *Microbes and Infection*, 18(10), 639–648. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.06.003>
- Gonçalves, L. A., Cravo, P., & Ferreira, M. U. (2014). Emerging Plasmodium vivax resistance to chloroquine in South America: An overview. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(5), 534–539. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130579>
- Gonçalves, R. M., Lima, N. F., & Ferreira, M. U. (2014). Parasite virulence, co-infections and cytokine balance in malaria. *Pathogens and Global Health*, 108(4), 173–178. <https://doi.org/10.1179/2047773214Y.0000000139>
- Gonçalves, R. M., Salmazi, K. C., Santos, B. A. N., Bastos, M. S., Rocha, S. C., Boscardin, S. B., Silber, A. M., Kallás, E. G., Ferreira, M. U., & Scopel, K. K. G. (2010). CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells, dendritic cells, and circulating cytokines in uncomplicated malaria: Do different parasite species elicit similar host responses? *Infection and Immunity*, 78(11), 4763–4772. <https://doi.org/10.1128/IAI.00578-10>
- Gonçalves, R. M., Scopel, K. K. G., Bastos, M. S., & Ferreira, M. U. (2012). Cytokine Balance in Human Malaria: Does Plasmodium vivax Elicit More Inflammatory Responses than Plasmodium falciparum? *PLoS ONE*, 7(9), e44394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044394>
- Götz, A., Tang, M. S., Ty, M. C., Arama, C., Ongoiba, A., Doumtabe, D., Traore, B., Crompton,

- P. D., Loke, P., & Rodriguez, A. (2017). Atypical activation of dendritic cells by *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(49), E10568–E10577. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708383114>
- Gowda, D. C., & Wu, X. (2018). Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. *Frontiers in Immunology*, 9, 3006. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03006>
- Grassi, B., Bignami, A., & Bastianelli, G. (1899). Medical Zoology: Further Researches upon the Cycle of Human Malaria in the Body of the Mosquito. *The Indian Medical Gazette*, 34(3), 104–107.
- Grimberg, B. T., Udomsangpetch, R., Xainli, J., McHenry, A., Panichakul, T., Sattabongkot, J., Cui, L., Bockarie, M., Chitnis, C., Adams, J., Zimmerman, P. A., & King, C. L. (2007). *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *PLoS Medicine*, 4(12), 1940–1948. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040337>
- Gruszczyk, J., Kanjee, U., Chan, L. J., Menant, S., Malleret, B., Lim, N. T. Y., Schmidt, C. Q., Mok, Y. F., Lin, K. M., Pearson, R. D., Rangel, G., Smith, B. J., Call, M. J., Weekes, M. P., Griffin, M. D. W., Murphy, J. M., Abraham, J., Sriprawat, K., Menezes, M. J., ... Tham, W. H. (2018). Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for *Plasmodium vivax*. *Science*, 359(6371), 48–55. <https://doi.org/10.1126/science.aan1078>
- Gupta, S., Singh, S., Popovici, J., Roesch, C., Shakri, A. R., Guillotte-Blisnick, M., Huon, C., Menard, D., & Chitnis, C. E. (2018). Targeting a reticulocyte binding protein and duffy binding protein to inhibit reticulocyte invasion by *plasmodium vivax*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28757-4>
- Han, H. J., Park, S. G., Kim, S. H., Hwang, S. Y., Han, J., Traicoff, J., Kho, W. G., & Chung, J. Y. (2004). Epidermal growth factor-like motifs 1 and 2 of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 are critical domains in erythrocyte invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(2), 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.06.008>
- Han, X., Yang, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Cao, H., Cao, Y., & Qi, Z. (2018). Potential Role for Regulatory B Cells as a Major Source of Interleukin-10 in Spleen from *Plasmodium chabaudi*-Infected Mice. *Infection and Immunity*, 86(5), 1–13. <https://doi.org/10.1128/IAI.00016-18>
- Hansen, D. S., Obeng-Adjei, N., Ly, A., Ioannidis, L. J., & Crompton, P. D. (2017). Emerging concepts in T follicular helper cell responses to malaria. *International Journal for Parasitology*, 47(2–3), 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.09.004>
- Haque, A., Best, S. E., Amante, F. H., Mustafah, S., Desbarrieres, L., De Labastida, F., Sparwasser, T., Hill, G. R., & Engwerda, C. R. (2010). CD4+ natural regulatory t cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded in vivo. *PLoS Pathogens*, 6(12), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001221>
- Hasan, M. M., Thompson-Snipes, L., Klintmalm, G., Demetris, A. J., O'Leary, J., Oh, S., & Joo, H. (2019). CD24 hi CD38 hi and CD24 hi CD27 + Human Regulatory B Cells Display Common and Distinct Functional Characteristics. *The Journal of Immunology*, 203(8), 2110–2120. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900488>
- Hensmann, M., Li, C., Moss, C., Lindo, V., Greer, F., Watts, C., Ogun, S. A., Holder, A. A., & Langhorne, J. (2004). Disulfide bonds in merozoite surface protein 1 of the malaria parasite impede efficient antigen processing and affect the in vivo antibody response. *European Journal of Immunology*, 34(3), 639–648. <https://doi.org/10.1002/eji.200324514>

- Hodder, A. N., Crewther, P. E., Matthewll, M. L. S. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., & Anders, R. F. (1996). The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 29446–29452. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.29446>
- Holder, A. A. (2009). The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: Structure, specific antibodies and immunity to malaria. *Parasitology*, 136(12), 1445–1456. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990515>
- Holder, A. A., Blackman, M. J., Burghaus, P. A., Chappel, J. A., Ling, I. T., McCallum-Deighton, N., & Shai, S. (1992). A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 87(Suppl 3), 37–42. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000700004>
- Homann, M. V., Emami, S. N., Yman, V., Stenström, C., Sondén, K., Ramström, H., Karlsson, M., Asghar, M., & Färnert, A. (2017). Detection of Malaria Parasites After Treatment in Travelers: A 12-months Longitudinal Study and Statistical Modelling Analysis. *EBioMedicine*, 25, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.10.003>
- Horowitz, A., Newman, K. C., Evans, J. H., Korbel, D. S., Davis, D. M., & Riley, E. M. (2010). Cross-Talk between T Cells and NK Cells Generates Rapid Effector Responses to Plasmodium falciparum - Infected Erythrocytes. *The Journal of Immunology*, 184(11), 6043–6052. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000106>
- Howell, S. A., Withers-Martinez, C., Kocken, C. H. M., Thomas, A. W., & Blackman, M. J. (2001). Proteolytic Processing and Primary Structure of Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen-1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 31311–31320. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103076200>
- Howes, R. E., Dewi, M., Hogg, M. M., Battle, K. E., Padilla, C. D., Baird, J. K., & Hay, S. I. (2012). G6PD Deficiency Prevalence and Estimates of Affected Populations in Malaria Endemic Countries: A Geostatistical Model-Based Map. *PLoS Medicine*, 9(11), e1001339. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001339>
- Hviid, L., Kemp, K., Kern, P., Wellinghausen, N., Matsumoto, J., Kawai, S., & Terao, K. (2000). What Is the Cause of Lymphopenia in Malaria? *Infection and Immunity*, 68(10), 6087–6089. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.10.6087-6089.2000>
- Jacob, F., Novo, C. P., Bachert, C., & Van Crombruggen, K. (2013). Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signalling*, 9(3), 285–306. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9357-4>
- Jahangiri, F., Jalallou, N., & Ebrahimi, M. (2019). Analysis of Apical Membrane Antigen (AMA)-1 characteristics using bioinformatics tools in order to vaccine design against Plasmodium vivax. *Infection, Genetics and Evolution*, 71(January), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.001>
- Jandl, C., Liu, S. M., Cañete, P. F., Warren, J., Hughes, W. E., Vogelzang, A., Webster, K., Craig, M. E., Uzel, G., Dent, A., Stepensky, P., Keller, B., Warnatz, K., Sprent, J., & King, C. (2017). IL-21 restricts T follicular regulatory T cell proliferation through Bcl-6 mediated inhibition of responsiveness to IL-2. *Nature Communications*, 8(May 2016). <https://doi.org/10.1038/ncomms14647>
- Jangpatarapongsa, K., Chootong, P., Sattabongkot, J., Chotivanich, K., Sirichaisinthop, J., Tungpradabkul, S., Hisaeda, H., Troye-Blomberg, M., Cui, L., & Udomsangpetch, R. (2008). Plasmodium vivax parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid

- dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *European Journal of Immunology*, 38(10), 2697–2705. <https://doi.org/10.1002/eji.200838186>
- Jangpatarapongsa, K., Sirichaisinthop, J., Sattabongkot, J., Cui, L., Montgomery, S. M., Looareesuwan, S., Troye-Blomberg, M., & Udomsangpetch, R. (2006). Memory T cells protect against *Plasmodium vivax* infection. *Microbes and Infection*, 8(3), 680–686. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.09.003>
- Kang, J. M., Ju, H. L., Kang, Y. M., Lee, D. H., Moon, S. U., Sohn, W. M., Park, J. W., Kim, T. S., & Na, B. K. (2012). Genetic polymorphism and natural selection in the C-terminal 42kDa region of merozoite surface protein-1 among *Plasmodium vivax* Korean isolates. *Malaria Journal*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-206>
- Kariuki, S. N., & Williams, T. N. (2020). Human genetics and malaria resistance. *Human Genetics*, 139(6–7), 801–811. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02142-6>
- Kho, S., Marfurt, J., Noviyanti, R., Kusuma, A., Piera, K. A., Burdam, F. H., Kenangalem, E., Lampah, D. A., Engwerda, C. R., Poespoprodjo, J. R., Price, R. N., Anstey, N. M., Minigo, G., & Woodberry, T. (2015). Preserved dendritic cell HLA-DR expression and reduced regulatory T cell activation in Asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infection. *Infection and Immunity*, 83(8), 3224–3232. <https://doi.org/10.1128/IAI.00226-15>
- Kimura, M., Kaneko, O., Liu, Q., Zhou, M., Fumihiko, K., Wataya, Y., Otani, S., Yamaguchi, Y., & Tanabe, K. (1997). Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitology International*, 46(2), 91–95. [https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(97\)00013-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(97)00013-5)
- King, C. L., Michon, P., Shakri, A. R., Marcotty, A., Stanistic, D., Zimmerman, P. A., Cole-Tobian, J. L., Mueller, I., & Chitnis, C. E. (2008). Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(24), 8363–8368. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800371105>
- Krotoski, W., Collins, W., Bray, R., Garnham, P., Cogswell, F., Gwadz, R., Killick-Kendrick, R., Wolf, R., Sinden, R., Koontz, L., & Stanfill, P. (1982). Demonstration of Hypnozoites in Sporozoite-Transmitted *Plasmodium vivax* Infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31(6), 1291–1293. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1982.31.1291>
- Kurup, S. P., Butler, N. S., & Harty, J. T. (2019). T cell-mediated immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology*, 19(7), 457–471. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0158-z>
- Kurup, S. P., Obeng-Adjei, N., Anthony, S. M., Traore, B., Doumbo, O. K., Butler, N. S., Crompton, P. D., & Harty, J. T. (2017). Regulatory T cells impede acute and long-term immunity to blood-stage malaria through CTLA-4. *Nature Medicine*, 23(10), 1220–1225. <https://doi.org/10.1038/nm.4395>
- Kwiatkowski, D. P. (2005). How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *American Journal of Human Genetics*, 77(2), 171–192. <https://doi.org/10.1086/432519>
- Lacerda, M. V. G., Llanos-Cuentas, A., Krudsood, S., Lon, C., Saunders, D. L., Mohammed, R., Yilma, D., Batista Pereira, D., Espino, F. E. J., Mia, R. Z., Chuquiyauri, R., Val, F., Casapia, M., Monteiro, W. M., Brito, M. A. M., Costa, M. R. F., Buathong, N., Noedl, H., Diro, E., ... Koh, G. C. K. W. (2019). Single-Dose Tafenoquine to Prevent Relapse of *Plasmodium vivax* Malaria. *New England Journal of Medicine*, 380(3), 215–228. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1710775>

- Lacerda, M. V. G., Mourão, M. P. G., Coelho, H. C., & Santos, J. B. (2011). Thrombocytopenia in malaria: Who cares? *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(SUPPL. 1), 52–63. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000900007>
- Lal, A. A., Hughes, M. A., Oliveira, D. A., Nelson, C., Bloland, P. B., Oloo, A. J., Hawley, W. E., Hightower, A. W., Nahlen, B. L., & Udhayakumar, V. (1996). Identification of T-cell determinants in natural immune responses to the Plasmodium falciparum apical membrane antigen (AMA-1) in an adult population exposed to malaria. *Infection and Immunity*, 64(3), 1054–1059. <https://doi.org/10.1128/iai.64.3.1054-1059.1996>
- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., Roques, M., Vulliez-Le Normand, B., Morlon-Guyot, J., Dubremetz, J. F., Fauquenoy, S., Tomavo, S., Faber, B. W., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Boulanger, M. J., Bentley, G. A., & Lebrun, M. (2011). The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathogens*, 7(2), e1001276. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001276>
- Langer, R. C., & Vinetz, J. M. (2001). Plasmodium ookinete-secreted chitinase and parasite penetration of the mosquito peritrophic matrix. *Trends in Parasitology*, 17(6), 269–272. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01918-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01918-3)
- Langhorne, J., Ndungu, F. M., Sponaas, A. M., & Marsh, K. (2008). Immunity to malaria: More questions than answers. *Nature Immunology*, 9(7), 725–732. <https://doi.org/10.1038/ni.f.205>
- Laurens, M. B. (2020). RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 16(3), 480–489. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1669415>
- Laveran, C. L. (1982). Classics in infectious diseases: A newly discovered parasite in the blood of patients suffering from malaria. Parasitic etiology of attacks of malaria: Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922). *Reviews of Infectious Diseases*, 4(4), 908–911. <https://doi.org/10.1093/4.4.908>
- Lim, K. J., Park, J. W., Yeom, J. S., Lee, Y. H., Yoo, S. B., Oh, J. H., Sohn, M. J., Bahk, Y. Y., & Kim, Y. S. (2004). Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can be remembered for more than 30 years in persons exposed to Plasmodium vivax. *Parasitology Research*, 92(5), 384–389. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1009-0>
- Lima-Junior, J. C., Jiang, J., 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. (2011). 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*, 29(9), 1801–1811. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.12.099>
- Lindqvist, M., Van Lunzen, J., Soghoian, D. Z., Kuhl, B. D., Ranasinghe, S., Kranias, G., Flanders, M. D., Cutler, S., Yudanin, N., Muller, M. I., Davis, I., Farber, D., Hartjen, P., Haag, F., Alter, G., Zur Wiesch, J. S., & Streeck, H. (2012). Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *Journal of Clinical Investigation*, 122(9), 3271–3280. <https://doi.org/10.1172/JCI64314>
- Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Rudicell, R. S., Robertson, J. D., Keele, B. F., Ndjango, J. N., Sanz, C. M., Morgan, D. B., Locatelli, S., Gonder, M. K., Kranzusch, P. J., Walsh, P. D., Mpoudi-ngole, E., Georgiev, A. V., Muller, M. N., Shaw, M., Peeters, M., Sharp, P. M., ... Beatrice, H. (2010). Origin of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in gorillas. *Nature*, 467(7314), 420–425. <https://doi.org/10.1038/nature09442>

- 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-Mundeye, S., Inogwabini, B. I., ... Sharp, P. M. (2014). African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature Communications*, 5(3346), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms4346>
- Liu, Y., Chen, Y., Li, Z., Han, Y., Sun, Y., Wang, Q., Liu, B., & Su, Z. (2013). Role of IL-10-producing regulatory B cells in control of cerebral malaria in *Plasmodium berghei* infected mice. *European Journal of Immunology*, 43(11), 2907–2918. <https://doi.org/10.1002/eji.201343512>
- Locci, M., Havenar-Daughton, C., Landais, E., Wu, J., Kroenke, M. A., Arlehamn, C. L., Su, L. F., Cubas, R., Davis, M. M., Sette, A., Haddad, E. K., Pognard, P., & Crotty, S. (2013). Human Circulating PD-1+ CXCR3- CXCR5+ Memory Tfh Cells Are Highly Functional and Correlate with Broadly Neutralizing HIV Antibody Responses. *Immunity*, 39(4), 758–769. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.031>. Human
- Long, C. A., & Zavala, F. (2017). Immune Responses in Malaria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(8), a025577. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025577>
- López, C., Yepes-Pérez, Y., Hincapié-Escobar, N., Díaz-Arévalo, D., & Patarroyo, M. A. (2017). What is known about the immune response induced by *Plasmodium vivax* malaria vaccine candidates? *Frontiers in Immunology*, 8(126), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00126>
- Loy, D., Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Plenderleith, L. J., Sundararaman, S. A., Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2017). Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *International J Parasitol*, 47(2–3), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.05.008>. Out
- Mace, K. E., Arguin, P. M., Lucchi, N. W., & Tan, K. R. (2019). Malaria surveillance - United States, 2016. *MMWR Surveillance Summaries*, 68(5), 1–35. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6805a1>
- Maceiras, A. R., Fonseca, V. R., Agua-Doce, A., & Graca, L. (2017). T follicular regulatory cells in mice and men. *Immunology*, 152(1), 25–35. <https://doi.org/10.1111/imm.12774>
- Maecker, H. T., Dunn, H. S., Suni, M. A., Khatamzas, E., Pitcher, C. J., Bunde, T., Persaud, N., Trigona, W., Fu, T.-M., Sinclair, E., Bredt, B. M., McCune, J. M., Maino, V. C., Kern, F., & Picker, L. J. (2001). Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 255(1–2), 27–40. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00416-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00416-1)
- Ménard, R., Tavares, J., Cockburn, I., Markus, M., Zavala, F., & Amino, R. (2013). Looking under the skin: The first steps in malarial infection and immunity. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 701–712. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3111>
- Metenou, S., Dembele, B., Konate, S., Dolo, H., Coulibaly, Y. I., Diallo, A. A., Soumaoro, L., Coulibaly, M. E., Coulibaly, S. Y., Sanogo, D., Doumbia, S. S., Traoré, S. F., Mahanty, S., Klion, A., & Nutman, T. B. (2011). Filarial Infection Suppresses Malaria-Specific Multifunctional Th1 and Th17 Responses in Malaria and Filarial Coinfections. *The Journal of Immunology*, 186(8), 4725–4733. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003778>
- Mfuh, K. O., Achonduh-Atijegbe, O. A., Bekindaka, O. N., Esemu, L. F., Mbakop, C. D., Gandhi, K., Leke, R. G. F., Taylor, D. W., & Nerurkar, V. R. (2019). A comparison of thick-film microscopy, rapid diagnostic test, and polymerase chain reaction for accurate diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Malaria Journal*, 18(1), 1–8.

<https://doi.org/10.1186/s12936-019-2711-4>

- Michon, P., Woolley, I., Wood, E. M., Kastens, W., Zimmerman, P. A., & Adams, J. H. (2001). Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the *P. vivax* ligand required for blood-stage infection. *Federation of European Biochemical Societies*, 495(1–2), 111–114. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02370-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02370-5)
- Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., & Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415(6872), 673–679. <https://doi.org/10.1038/415673a>
- Miller, L. H., Mason, S. J., Clyde, D. F., & McGinniss, M. H. (1976). The Resistance Factor to *Plasmodium vivax* in Blacks. *New England Journal of Medicine*, 295(6), 302–304. <https://doi.org/10.1056/nejm197608052950602>
- Miller, R. L., Ikram, S., Armelagoss, G. J., Walker, R., Harers, B., Shiffi, C. J., Baggett, D., Carrigan, M., & Maret, S. M. (1994). Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in mummies using the rapid manual ParaSight™-F test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(1), 31–32. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90484-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90484-7)
- Milner, D. A. (2018). Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>
- Minigo, G., Woodberry, T., Piera, K. A., Salwati, E., Tjitra, E., Kenangalem, E., Price, R. N., Engwerda, C. R., Anstey, N. M., & Plebanski, M. (2009). Parasite-dependent expansion of TNF receptor II–positive regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe Malaria. *PLoS Pathogens*, 5(4), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000402>
- Ministério da Saúde (BR). (2005). *Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília.* https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/malaria_diag_manual_final.pdf
- Ministério da Saúde (BR). (2019a). *Boletim Epidemiológico: Descrição do processo de monitoramento dos testes de diagnóstico rápido de malária, Brasil, 2014 a 2016. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília.* <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/01/2018-066.pdf>
- Ministério da Saúde (BR). (2019b). *Lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária.* <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/25/Lista-de-municipios-pertencentes-as-areas-de-risco-ou-endemicas-para-malaria.pdf>
- Ministério da Saúde (BR). (2020a). *Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília* (Vol. 51, Issue 17). <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>
- Ministério da Saúde (BR). (2020b). *Boletim Epidemiológico Malária. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília.* https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/03/boletim_especial_malaria_1dez20_final.pdf
- Ministério da Saúde (BR). (2020c). *Guia de tratamento da malária no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Brasília.* http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_%0Atratamento_malaria_brasil.pdf
- Mitchell, G. H., Thomas, A. W., Margos, G., Dluzewski, A. R., & Bannister, L. H. (2004). Apical Membrane Antigen 1, a Major Malaria Vaccine Candidate, Mediates the Close

- Attachment of Invasive Merozoites to Host Red Blood Cells. *Infection and Immunity*, 72(1), 154–158. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.154-158.2004>
- Mockenhaupt, F. P., Ehrhardt, S., Gellert, S., Otchwemah, R. N., Dietz, E., Anemana, S. D., & Bienzle, U. (2004). α -thalassemia protects African children from severe malaria. *Blood*, 104(7), 2003–2006. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-4090>
- Moody, M. A., Pedroza-Pacheco, I., Vandergrift, N. A., Chui, C., Lloyd, K. E., Parks, R., Soderberg, K. A., Ogbe, A. T., Cohen, M. S., Liao, H. X., Gao, F., McMichael, A. J., Montefiori, D. C., Verkoczy, L., Kelsoe, G., Huang, J., Shea, P. R., Connors, M., Borrow, P., & Haynes, B. F. (2016). Immune perturbations in HIV-1–infected individuals who make broadly neutralizing antibodies. *Science Immunology*, 1(1). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aag0851>
- Morais, C. G., Soares, I. S., Carvalho, L. H., Fontes, C. J. F., Krettli, A. U., & Braga, É. M. (2005). IgG isotype to C-terminal 19 kDa of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. *Parasitology Research*, 95(6), 420–426. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1314-x>
- Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S. E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S. K., Sabzghabaei, N., Lavecchio, E. M., Punaro, M., Pascual, V., Banchereau, J., & Ueno, H. (2011). Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity*, 34(1), 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.012>
- Moxon, C. A., Gibbins, M. P., McGuinness, D., Milner, D. A., & Marti, M. (2020). New Insights into Malaria Pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15, 315–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032640>
- Muellenbeck, M. F., Ueberheide, B., Amulic, B., Epp, A., Fenyo, D., Busse, C. E., Esen, M., Theisen, M., Mordmüller, B., & Wardemann, H. (2013). Atypical and classical memory B cells produce plasmodium falciparum neutralizing antibodies. *Journal of Experimental Medicine*, 210(2), 389–399. <https://doi.org/10.1084/jem.20121970>
- Mueller, I., Galinski, M. R., Baird, J. K., Carlton, J. M., Kochar, D. K., Alonso, P. L., & del Portillo, H. A. (2009). Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(9), 555–566. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)
- Mueller, I., Shakri, A. R., & Chitnis, C. E. (2015). Development of vaccines for Plasmodium vivax malaria. *Vaccine*, 33(52), 7489–7495. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.060>
- Múfalo, B. C., Gentil, F., Bargieri, D. Y., Costa, F. T. M., Rodrigues, M. M., & Soares, I. S. (2008). Plasmodium vivax apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. *Microbes and Infection*, 10(12–13), 1266–1273. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.023>
- Murhandarwati, E. E. H., Herningtyas, E. H., Puspawati, P., Mau, F., Chen, S. B., Shen, H. M., & Chen, J. H. (2020). Genetic diversity of Merozoite surface protein 1–42 (MSP1-42) fragment of Plasmodium vivax from Indonesian isolates: Rationale implementation of candidate MSP1 vaccine. *Infection, Genetics and Evolution*, 85(June), 104573. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104573>
- Murta, F. L. G., Mendes, M. O., Sampaio, V. S., Junior, A. S. B., Díaz-Bermúdez, X. P., Monteiro, W. M., & Lacerda, M. V. G. (2019). Misperceptions of patients and health

- workers regarding malaria elimination in the Brazilian Amazon: A qualitative study. *Malaria Journal*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2854-3>
- Narum, D. L., & Thomas, A. W. (1994). Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 67(1), 59–68. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)90096-5](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)90096-5)
- Naus, C. W. A., Jones, F. M., Satti, M. Z., Joseph, S., Riley, E. M., Kimani, G., Mwatha, J. K., Kariuki, C. H., Ouma, J. H., Kabatereine, N. B., Vennervald, B. J., & Dunne, D. W. (2003). Serological responses among individuals in areas where both schistosomiasis and malaria are endemic: Cross-reactivity between *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium falciparum*. *Journal of Infectious Diseases*, 187(8), 1272–1282. <https://doi.org/10.1086/368361>
- Neghina, R., Neghina, A. M., Marincu, I., & Iacobiciu, I. (2010). Malaria, a journey in time: In search of the lost myths and forgotten stories. *American Journal of the Medical Sciences*, 340(6), 492–498. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3181e7fe6c>
- Nicolete, V. C., Frischmann, S., Barbosa, S., King, C. L., & Ferreira, M. U. (2016). Naturally acquired binding-inhibitory antibodies to plasmodium vivax duffy binding protein and clinical immunity to malaria in rural amazonians. *Journal of Infectious Diseases*, 214(10), 1539–1546. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw407>
- Nogueira, P. A., Alves, F. P., Fernandez-Becerra, C., Pein, O., Santos, N. R., Pereira Da Silva, L. H., Camargo, E. P., & Del Portillo, H. A. (2006). A reduced risk of infection with *Plasmodium vivax* and clinical protection against malaria are associated with antibodies against the N terminus but not the C terminus of merozoite surface protein 1. *Infection and Immunity*, 74(5), 2726–2733. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.5.2726-2733.2006>
- Ntumngia, F. B., Schloegel, J., Barnes, S. J., Mchenry, A. M., Singh, S., King, C. L., & Adams, J. H. (2012). Conserved and variant epitopes of *Plasmodium vivax* duffy binding protein as targets of inhibitory monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, 80(3), 1203–1208. <https://doi.org/10.1128/IAI.05924-11>
- Obaldia, N., Meibalan, E., Sa, J. M., Ma, S., Clark, M. A., Mejia, P., Moraes Barros, R. R., Otero, W., Ferreira, M. U., Mitchell, J. R., Milner, D. A., Huttenhower, C., Wirth, D. F., Duraisingh, M. T., Wellems, T. E., & Marti, M. (2018). Bone marrow is a major parasite reservoir in plasmodium vivax infection. *MBio*, 9(3), e00625-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00625-18>
- Obeng-Adjei, N., Portugal, S., Holla, P., Li, S., Sohn, H., Ambegaonkar, A., Skinner, J., Bowyer, G., Doumbo, O. K., Traore, B., Pierce, S. K., & Crompton, P. D. (2017). Malaria-induced interferon- γ drives the expansion of Tbethi atypical memory B cells. *PLoS Pathogens*, 13(9), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006576>
- Obeng-Adjei, N., Portugal, S., Tran, T. M., Yazew, T. B., Skinner, J., Li, S., Jain, A., Felgner, P. L., Doumbo, O. K., Kayentao, K., Ongoiba, A., Traore, B., & Crompton, P. D. (2015). Circulating Th1-Cell-type Tfh Cells that Exhibit Impaired B Cell Help Are Preferentially Activated during Acute Malaria in Children. *Cell Reports*, 13(2), 425–439. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.004>
- Ohashi, J., Naka, I., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Brittenham, G., Looareesuwan, S., Clark, A. G., & Tokunaga, K. (2004). Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin E variant due to malarial selection. *American Journal of Human Genetics*, 74(6), 1198–1208. <https://doi.org/10.1086/421330>

- Osii, R. S., Otto, T. D., Garside, P., Ndungu, F. M., & Brewer, J. M. (2020). The Impact of Malaria Parasites on Dendritic Cell–T Cell Interaction. *Frontiers in Immunology*, *11*(July), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01597>
- Patgaonkar, M., Herbert, F., Powale, K., Gandhe, P., Gogtay, N., Thatte, U., Pied, S., Sharma, S., & Pathak, S. (2018). Vivax infection alters peripheral B-cell profile and induces persistent serum IgM. *Parasite Immunology*, *40*(10), 1–14. <https://doi.org/10.1111/pim.12580>
- Payne, R. O., Silk, S. E., Elias, S. C., Milne, K. H., Rawlinson, T. A., Llewellyn, D., Shakri, A. R., Jin, J., Labbé, G. M., Edwards, N. J., Poulton, I. D., Roberts, R., Farid, R., Jørgensen, T., Alanine, D. G., de Cassan, S. C., Higgins, M. K., Otto, T. D., McCarthy, J. S., ... Draper, S. J. (2017). Human vaccination against Plasmodium vivax Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. *JCI Insight*, *2*(12), 1–17. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93683>
- Pérez-Mazliah, D., Ndungu, F. M., Aye, R., & Langhorne, J. (2020). B-cell memory in malaria: Myths and realities. *Immunological Reviews*, *293*(1), 57–69. <https://doi.org/10.1111/imr.12822>
- Pierrot, C., Wilson, S., Lallet, H., Lafitte, S., Jones, F. M., Daher, W., Capron, M., Dunne, D. W., & Khalife, J. (2006). Identification of a novel antigen of Schistosoma mansoni shared with Plasmodium falciparum and evaluation of different cross-reactive antibody subclasses induced by human schistosomiasis and malaria. *Infection and Immunity*, *74*(6), 3347–3354. <https://doi.org/10.1128/IAI.01724-05>
- Pires, C. V., Alves, J. R. S., Lima, B. A. S., Paula, R. B., Costa, H. L., Torres, L. M., Sousa, T. N., Soares, I. S., Sanchez, B. A. M., Fontes, C. J. F., Ntumngia, F. B., Adams, J. H., Kano, F. S., & Carvalho, L. H. (2018). Blood-stage Plasmodium vivax antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. *PLoS ONE*, *13*(11), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207244>
- Portugal, S., Tipton, C. M., Sohn, H., Kone, Y., Wang, J., Li, S., Skinner, J., Virtaneva, K., Sturdevant, D. E., Porcella, S. F., Doumbo, O. K., Doumbo, S., Kayentao, K., Ongoiba, A., Traore, B., Sanz, I., Pierce, S. K., & Crompton, P. D. (2015). Malaria-associated atypical memory B cells exhibit markedly reduced B cell receptor signaling and effector function. *ELife*, *4*(MAY), 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.07218>
- Precopio, M. L., Butterfield, T. R., Casazza, J. P., Little, S. J., Richman, D. D., Koup, R. A., & Roederer, M. (2008). Optimizing peptide matrices for identifying T-cell antigens. *Cytometry Part A*, *73*(11), 1071–1078. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20646>
- Price, R. N., Tjitra, E., Guerra, C. A., Yeung, S., White, N. J., & Anstey, N. M. (2007). Vivax malaria: Neglected and not benign. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *77*(SUPPL. 6), 79–87. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.79>
- Rawlinson, T. A., Barber, N. M., Mohring, F., Cho, J. S., Kosaisavee, V., Gérard, S. F., Alanine, D. G. W., Labbé, G. M., Elias, S. C., Silk, S. E., Quinkert, D., Jin, J., Marshall, J. M., Payne, R. O., Minassian, A. M., Russell, B., Rénia, L., Nosten, F. H., Moon, R. W., ... Draper, S. J. (2019). Structural basis for inhibition of Plasmodium vivax invasion by a broadly neutralizing vaccine-induced human antibody. *Nature Microbiology*, *4*(9), 1497–1507. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0462-1>
- Riccio, E. K., Totino, P. R., Pratt-Riccio, L. R., Ennes-Vidal, V., Soares, I. S., Rodrigues, M. M., De Souza, J. M., Daniel-Ribeiro, C. T., & Ferreira-Da-Cruz, M. D. F. (2013). Cellular and humoral immune responses against the Plasmodium vivax MSP-119 malaria vaccine candidate in individuals living in an endemic area in north-eastern Amazon region of

Brazil. *Malaria Journal*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-326>

- Richards, D. M., Delacher, M., Goldfarb, Y., Kägebein, D., Hofer, A. C., Abramson, J., & Feuerer, M. (2015). Treg Cell Differentiation: From Thymus to Peripheral Tissue. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 136). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.07.014>
- Rieckmann, K. H., Davis, D. R., & Hutton, D. C. (1989). Plasmodium Vivax Resistance To Chloroquine? *The Lancet*, 2(8673), 1183–1184. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)91792-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)91792-3)
- Rodrigues-Da-Silva, R. N., Da Silva, J. H. M., Singh, B., Jiang, J., Meyer, E. V. S., Santos, F., Banic, D. M., Moreno, A., Galinski, M. R., Oliveira-Ferreira, J., & Da Costa Lima, J. (2016). In silico identification and validation of α linear and naturally immunogenic B-cell epitope of the Plasmodium vivax malaria vaccine candidate merozoite surface protein-9. *PLoS ONE*, 11(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146951>
- Rodrigues-da-Silva, R. N., Lima-Junior, J. da C., Fonseca e Fonseca, B. de P., Zuquim Antas, P. R., Baldez, A., Storer, F. L., Santos, F., Banic, D. M., & de Oliveira-Ferreira, J. (2014). Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(2), 154–162. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140275>
- Rodrigues, M. H. C., Rodrigues, K. M., Oliveira, T. R., Cômodo, A. N., Rodrigues, M. M., Kocken, C. H. M., Thomas, A. W., & Soares, I. S. (2005). Antibody response of naturally infected individuals to recombinant Plasmodium vivax apical membrane antigen-1. *International Journal for Parasitology*, 35(2), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.11.003>
- Rodrigues, P. T., Valdivia, H. O., De Oliveira, T. C., Alves, J. M. P., Duarte, A. M. R. C., Cerutti-Junior, C., Buery, J. C., Brito, C. F. A., De Souza, J. C., Hirano, Z. M. B., Bueno, M. G., Catão-Dias, J. L., Malafronte, R. S., Ladeia-Andrade, S., Mita, T., Santamaria, A. M., Calzada, J. E., Tantular, I. S., Kawamoto, F., ... Ferreira, M. U. (2018). Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19554-0>
- Rodríguez, L. E., Urquiza, M., Ocampo, M., Curtidor, H., Suárez, J., García, J., Vera, R., Puentes, Á., López, R., Pinto, M., Rivera, Z., & Patarroyo, M. E. (2002). Plasmodium vivax MSP-1 peptides have high specific binding activity to human reticulocytes. *Vaccine*, 20(9–10), 1331–1339. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00472-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00472-8)
- Roederer, M., & Koup, R. A. (2003). Optimized determination of T cell epitope responses. *Journal of Immunological Methods*, 274(1–2), 221–228. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00423-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00423-4)
- Romagnani, S., Maggi, E., Liotta, F., Cosmi, L., & Annunziato, F. (2009). Properties and origin of human Th17 cells. *Molecular Immunology*, 47(1), 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.12.019>
- Ross, R. (1897). On some peculiar pigmented cells found in two mosquitos fed on malarial blood. *British Medical Journal*, 2(1929), 1786–1788. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.1929.1786>
- Rosser, E. C., & Mauri, C. (2015). Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity*, 42(4), 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005>

- Rougeron, V., Elguero, E., Arnathau, C., Hidalgo, B. A., Durand, P., Houze, S., Berry, A., Zakeri, S., Haque, R., Alam, M. S., Nosten, F., Severini, C., Woldearegai, T. G., Mordmüller, B., Kremsner, P. G., González-Cerón, L., Fontecha, G., Gamboa, D., Musset, L., ... Prugnolle, F. (2020). Human plasmodium vivax diversity, population structure and evolutionary origin. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *14*(3), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008072>
- Ryan, J. R., Stoute, J. A., Amon, J., Dunton, R. F., Mtalib, R., Koros, J., Owour, B., Luckhart, S., Wirtz, R. A., Barnwell, J. W., & Rosenberg, R. (2006). Evidence for transmission of Plasmodium vivax among a Duffy antigen negative population in Western Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *75*(4), 575–581.
- Ryg-Cornejo, V., Ioannidis, L. J., Ly, A., Chiu, C. Y., Tellier, J., Hill, D. L., Preston, S. P., Pellegrini, M., Yu, D., Nutt, S. L., Kallies, A., & Hansen, D. S. (2016). Severe Malaria Infections Impair Germinal Center Responses by Inhibiting T Follicular Helper Cell Differentiation. *Cell Reports*, *14*(1), 68–81. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.006>
- Sage, P. T., & Sharpe, A. H. (2016). T follicular regulatory cells. *Immunological Reviews*, *271*(1), 246–259. <https://doi.org/10.1111/imr.12411>
- Salavatifar, M., Zakeri, S., Roodbari, N. H., & Djadid, N. D. (2015). High-level expression, purification and characterization of a recombinant plasmodium vivax apical membrane antigen 1: Implication for vivax malaria vaccine development. *Cell Journal*, *17*(3), 520–531. <https://doi.org/10.22074/cellj.2015.12>
- Salimi, N., Fleri, W., Peters, B., & Sette, A. (2010). Design and utilization of epitope-based databases and predictive tools. *Immunogenetics*, *62*(4), 185–196. <https://doi.org/10.1007/s00251-010-0435-2>
- Sallusto, F., Cassotta, A., Hoces, D., Foglierini, M., & Lanzavecchia, A. (2018). Do memory CD4 T cells keep their cell-type programming: Plasticity versus fate commitment?: T-cell heterogeneity, plasticity, and selection in humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(3), 1–8. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029421>
- Sandquist, I., & Kolls, J. (2018). Update on regulation and effector functions of Th17 cells. *F1000Research*, *7*(0), 1–8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13020.1>
- Saze, Z., Schuler, P. J., Hong, C. S., Cheng, D., Jackson, E. K., & Whiteside, T. L. (2013). Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood*, *122*(1), 9–18. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-482406>
- Schlagenhauf, P. (2004). Malaria: From prehistory to present. *Infectious Disease Clinics of North America*, *18*(2), 189–205. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.01.002>
- Scholzen, A., & Sauerwein, R. W. (2016). Immune activation and induction of memory: Lessons learned from controlled human malaria infection with Plasmodium falciparum. *Parasitology*, *143*(2), 224–235. <https://doi.org/10.1017/S0031182015000761>
- Shevryev, D., & Tereshchenko, V. (2020). Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Frontiers in Immunology*, *10*(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03100>
- Shortt, H. E., & Garnham, P. C. C. (1948). Pre-erythrocytic Stage in Mammalian Malaria Parasites. *Nature*, *161*(4082), 126. <https://doi.org/10.1038/161126b0>
- Shortt, H. E., Garnham, P. C. C., Covell, G., & Shute, P. G. (1948). Pre-Erythrocytic Stage of Human Malaria, Plasmodium Vivax. *British Medical Journal*, *1*(4550), 547.
- Siewe, B., Stapleton, J. T., Martinson, J., Keshavarzian, A., Kazmi, N., Demarais, P. M.,

- French, A. L., & Landay, A. (2013). Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8 + T cell function in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, 93(5), 811–818. <https://doi.org/10.1189/jlb.0912436>
- Silveira, E. L. V., Dominguez, M. R., & Soares, I. S. (2018). To B or Not to B : Understanding B Cell Responses in the Development of Malaria Infection. *Frontiers in Immunology*, 9(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02961>
- Silvie, O., Franetich, J. F., Charrin, S., Mueller, M. S., Siau, A., Bodescot, M., Rubinstein, E., Hannoun, L., Charoenvit, Y., Kocken, C. H., Thomas, A. W., Van Gemert, G. J., Sauerwein, R. W., Blackman, M. J., Anders, R. F., Pluschke, G., & Mazier, D. (2004). A Role for Apical Membrane Antigen 1 during Invasion of Hepatocytes by Plasmodium falciparum Sporozoites. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9490–9496. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311331200>
- Singh, B., Sung, L. K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S. S. G., Cox-singh, J., Thomas, A., & Conway, D. J. (2004). A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet*, 363(9414), 1017–1024.
- Singh, K., Mukherjee, P., Shakri, A. R., Singh, A., Pandey, G., Bakshi, M., Uppal, G., Jena, R., Rawat, A., Kumar, P., Bhardwaj, R., Yazdani, S. S., Hans, D., Mehta, S., Srinivasan, A., Anil, K., Madhusudhan, R. L., Patel, J., Singh, A., ... Chitnis, C. E. (2018). Malaria vaccine candidate based on Duffy-binding protein elicits strain transcending functional antibodies in a Phase I trial. *Npj Vaccines*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0083-3>
- Siqueira, A. M., Lacerda, M. V. G., Magalhães, B. M. L., Mourão, M. P. G., Melo, G. C., Alexandre, M. A. A., Alecrim, M. G. C., Kochar, D., Kochar, S., Kochar, A., Nayak, K., del Portillo, H., Guinovart, C., Alonso, P., & Bassat, Q. (2015). Characterization of Plasmodium vivax-associated admissions to reference hospitals in Brazil and India. *BMC Medicine*, 13(57), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0302-y>
- Soares, I. S., Barnwell, J. W., Ferreira, M. U., Da Cunha, M. G., Laurino, J. P., Castilho, B. A., & Rodrigues, M. M. (1999). A Plasmodium vivax vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. *Molecular Medicine*, 5(7), 459–470. <https://doi.org/10.1007/bf03403539>
- Soares, I. S., Da Cunha, M. G., Silva, M. N., Souza, J. M., Del Portillo, H. A., & Rodrigues, M. M. (1999). Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C- terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(3), 357–363. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.357>
- Soares, I. S., Levitus, G., Souza, J. M., Del Portillo, H. A., & Rodrigues, M. M. (1997). Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of Plasmodium vivax merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infection and Immunity*, 65(5), 1606–1614. <https://doi.org/10.1128/iai.65.5.1606-1614.1997>
- Soares, R. R., Antinarelli, L. M. R., Abramo, C., Macedo, G. C., Coimbra, E. S., & Scopel, K. K. G. (2017). What do we know about the role of regulatory B cells (Breg) during the course of infection of two major parasitic diseases, malaria and leishmaniasis? *Pathogens and Global Health*, 111(3), 107–115. <https://doi.org/10.1080/20477724.2017.1308902>
- Soares, R. R., Cunha, C. F., Ferraz-Nogueira, R., Marins-dos-Santos, A., Rodrigues-da-Silva, R. N., da Silva Soares, I., da Costa Lima-Junior, J., Bertho, A. L., Ferreira, M. U., & Scopel, K. K. G. (2019). Apical membrane protein 1-specific antibody profile and temporal changes in peripheral blood B-cell populations in Plasmodium vivax malaria. *Parasite Immunology*, 41(9), 1–9. <https://doi.org/10.1111/pim.12662>

- Soon, M. S. F., & Haque, A. (2018). Recent Insights into CD4 + Th Cell Differentiation in Malaria. *The Journal of Immunology*, 200(6), 1965–1975. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701316>
- Sospedra, M., Pinilla, C., & Martin, R. (2003). Use of combinatorial peptide libraries for T-cell epitope mapping. *Methods*, 29(3), 236–247. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00346-8](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00346-8)
- Stephens, R., Albano, F. R., Quin, S., Pascal, B. J., Harrison, V., Stockinger, B., Kioussis, D., Weltzien, H. U., & Langhorne, J. (2005). Malaria-specific transgenic CD4+ T cells protect immunodeficient mice from lethal infection and demonstrate requirement for a protective threshold of antibody production for parasite clearance. *Blood*, 106(5), 1676–1684. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-10-4047>
- Struik, S. S., & Riley, E. M. (2004). Does malaria suffer from lack of memory? *Immunological Reviews*, 201, 268–290. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00181.x>
- Sullivan, R. T., Ssewanyana, I., Wamala, S., Nankya, F., Jagannathan, P., Tappero, J. W., Mayanja-Kizza, H., Muhindo, M. K., Arinaitwe, E., Kamya, M., Dorsey, G., Feeney, M. E., Riley, E. M., Drakeley, C. J., Greenhouse, B., & Sullivan, R. (2016). B cell sub-types following acute malaria and associations with clinical immunity. *Malaria Journal*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1190-0>
- Sutherland, C. J. (2016). Persistent Parasitism: The Adaptive Biology of Malariae and Ovale Malaria. *Trends in Parasitology*, 32(10), 808–819. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.07.001>
- Triglia, T., Healer, J., Caruana, S. R., Hodder, A. N., Anders, R. F., Crabb, B. S., & Cowman, A. F. (2000). Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by Plasmodium species. *Molecular Microbiology*, 38(4), 706–718. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02175.x>
- Udhayakumar, V., Anyona, D., Kariuki, S., Bloland, P. B., Branch, O. H., Weiss, W., Nahlen, B. L., Kaslow, D. C., & Lal, A. A. (1995). Identification of T and B cell epitopes recognized by humans in the C- terminal 42-kDa domain of the plasmodium falciparum merozoite surface protein (MSP)-1. *The Journal of Immunology*, 154(11), 6022–6030.
- Urusova, D., Carias, L., Huang, Y., Nicolete, V. C., Popovici, J., Roesch, C., Salinas, N. D., Witkowski, B., Ferreira, M. U., Adams, J. H., Gross, M. L., King, C. L., & Tolia, N. H. (2019). Structural basis for neutralization of Plasmodium vivax by naturally acquired human antibodies that target DBP. *Nature Microbiology*, 4(9), 1486–1496. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0461-2>
- Vicentin, E. C., Franoso, K. S., Rocha, M. V., Iourtov, D., dos Santos, F. L., Kubrusly, F. S., Sakauchi, M. A., Raw, I., Nosten, F., Renia, L., Rodrigues, M. M., Russell, B., & Soares, I. S. (2014). Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with Plasmodium vivax apical membrane antigen-1 expressed in Pichia pastoris yeast. *Infection and Immunity*, 82(3), 1296–1307. <https://doi.org/10.1128/IAI.01169-13>
- Vinetz, J. M. (2005). Plasmodium ookinete invasion of the mosquito midgut. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 295, 357–382. https://doi.org/10.1007/3-540-29088-5_14
- Walker, J. A., & McKenzie, A. N. J. (2018). TH2 cell development and function. *Nature Reviews Immunology*, 18(2), 121–133. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.118>
- Walther, M., Tongren, J. E., Andrews, L., Korbelt, D., King, E., Fletcher, H., Andersen, R. F., Bejon, P., Thompson, F., Dunachie, S. J., Edele, F., De Souza, J. B., Sinden, R. E.,

- Gilbert, S. C., Riley, E. M., & Hill, A. V. S. (2005). Upregulation of TGF- β , FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity*, 23(3), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.08.006>
- Wang, Li, Qiu, J., Yu, L., Hu, X., Zhao, P., & Jiang, Y. (2014). Increased numbers of CD5+CD19+CD1dhighIL-10+ Bregs, CD4+Foxp3+ Tregs, CD4+CXCR5+Foxp3+ follicular regulatory T (TFR) cells in CHB or CHC patients. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0251-9>
- Wang, Luman, Fu, Y., & Chu, Y. (2020). Regulatory B Cells. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1254, pp. 87–103). https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1_8
- Wang, Q., Zhao, Z., Zhang, X., Li, X., Zhu, M., Li, P., Yang, Z., Wang, Y., Yan, G., Shang, H., Cao, Y., Fan, Q., & Cui, L. (2016). Naturally acquired antibody responses to plasmodium vivax and plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein 1 (MSP1) C-Terminal 19 kDa domains in an area of unstable malaria transmission in Southeast Asia. *PLoS ONE*, 11(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151900>
- Weatherall, D. J., & Clegg, J. B. (2001). Inherited haemoglobin disorders: An increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*, 79(8), 704–712. <https://doi.org/10.1590/S0042-96862001000800005>
- Weiss, G. E., Crompton, P. D., Li, S., Laura, A., Moir, S., Traore, B., Kayentao, K., Ongoiba, A., Doumbo, O. K., Pierce, S. K., Weiss, G. E., Crompton, P. D., Li, S., Walsh, L. A., Moir, S., Traore, B., Kayentao, K., Ongoiba, A., Doumbo, O. K., & Pierce, S. K. (2009). Atypical Memory B Cells Are Greatly Expanded in Individuals Living in a Malaria-Endemic Area. *Journal of Immunology*, 183(3), 2176–2182. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901297>
- Wertheimer, S. P., & Barnwell, J. W. (1989). Plasmodium vivax interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: Identification of a parasite receptor-like protein. *Experimental Parasitology*, 69(3), 340–350. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(89\)90083-0](https://doi.org/10.1016/0014-4894(89)90083-0)
- White, M. T., Bejon, P., Olotu, A., Griffin, J. T., Riley, E. M., Kester, K. E., Ockenhouse, C. F., & Ghani, A. C. (2013). The Relationship between RTS,S Vaccine-Induced Antibodies, CD4+ T Cell Responses and Protection against Plasmodium falciparum Infection. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061395>
- White, M. T., Verity, R., Griffin, J. T., Asante, K. P., Owusu-Agyei, S., Greenwood, B., Drakeley, C., Gesase, S., Lusingu, J., Ansong, D., Adjei, S., Agbenyega, T., Ogutu, B., Otieno, L., Otieno, W., Agnandji, S. T., Lell, B., Kremsner, P., Hoffman, I., ... Ghani, A. C. (2015). Immunogenicity of the RTS,S/AS01 malaria vaccine and implications for duration of vaccine efficacy: Secondary analysis of data from a phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(12), 1450–1458. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00239-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00239-X)
- White, N. J. (2008). Plasmodium knowlesi : The Fifth Human Malaria Parasite. *Clin Infect Dis*, 46(2), 172–173. <https://doi.org/10.1086/524889>
- Williams, T. N., Wambua, S., Uyoga, S., Macharia, A., Mwacharo, J. K., Newton, C. R. J. C., & Maitland, K. (2005). Both heterozygous and homozygous α^+ thalassaemias protect against severe and fatal Plasmodium falciparum malaria on the coast of Kenya. *Blood*, 106(1), 368–371. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0313>
- Wipasa, J., Suphavitai, C., Okell, L. C., Cook, J., Corran, P. H., Thaikla, K., Liwisaaree, W.,

- Riley, E. M., & Hafalla, J. C. R. (2010). Long-lived antibody and B cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathogens*, *6*(2), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000770>
- Wiscovitch-Russo, R., Narganes-Stordes, Y., Cano, R. J., & Toranzos, G. A. (2019). Origin of the New World *Plasmodium vivax*: Facts and New Approaches. *International Microbiology*, *22*(3), 337–342. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-00053-1>
- World Health Organization. (2011). Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. In *Geneva*. <https://doi.org/2011>
- World Health Organization. (2015a). Guidelines for the treatment of malaria. In *Geneva*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549127>
- World Health Organization. (2015b). World Malaria Report 2015. In *Geneva*. <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>
- World Health Organization. (2019). World Malaria Report 2019. In *Geneva*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- World Health Organization. (2020). World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. In *Geneva*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791>
- Wright, G. J., & Rayner, J. C. (2014). *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Invasion: Combining Function with Immune Evasion. *PLoS Pathogens*, *10*(3), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003943>
- Wu, H., Xia, L., Jia, D., Zou, H., Jin, G., Qian, W., Xu, H., & Li, T. (2020). PD-L1+ regulatory B cells act as a T cell suppressor in a PD-L1-dependent manner in melanoma patients with bone metastasis. *Molecular Immunology*, *119*(January), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.01.008>
- Xainli, J., Adams, J. H., & King, C. L. (2000). The erythrocyte binding motif of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *111*(2), 253–260. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00315-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00315-7)
- Xainli, J., Baisor, M., Kastens, W., Bockarie, M., Adams, J. H., & King, C. L. (2002). Age-Dependent Cellular Immune Responses to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein in Humans. *The Journal of Immunology*, *169*(6), 3200–3207. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.6.3200>
- Yalcindag, E., Elguero, E., Arnathau, C., Durand, P., Akiana, J., Anderson, T. J., Aubouy, A., Balloux, F., Besnard, P., Bogueau, H., Carnevale, P., D'Alessandro, U., Fontenille, D., Gamboa, D., Jombart, T., Le Mire, J., Leroy, E., Maestre, A., Mayxay, M., ... Prugnolle, F. (2012). Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(2), 511–516. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119058109>
- Yam, X. Y., & Preiser, P. R. (2017). Host immune evasion strategies of malaria blood stage parasite. *Molecular BioSystems*, *13*(12), 2498–2508. <https://doi.org/10.1039/c7mb00502d>
- Yap, X. Z., Hustin, L. S. P., & Sauerwein, R. W. (2019). Th1-polarized Tfh cells delay naturally-acquired immunity to malaria. *Frontiers in Immunology*, *10*(MAY), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01096>
- Zaimoku, Y., Patel, B. A., Kajigaya, S., Feng, X., Alemu, L., Quinones Raffo, D., Groarke, E.

- M., & Young, N. S. (2020). Deficit of circulating CD19+CD24hiCD38hi regulatory B cells in severe aplastic anaemia. *British Journal of Haematology*, 190(4), 610–617. <https://doi.org/10.1111/bjh.16651>
- Zanini, G. M., de Moura Carvalho, L. J., Brahimi, K., de Souza-Passos, L. F., Guimarães, S. J., da Silva Machado, E., Bianco-Junior, C., Riccio, E. K. P., de Sousa, M. A., Alecrim, M. D. G. C., Leite, N., Druilhe, P., & Daniel-Ribeiro, C. T. (2009). Sera of patients with systemic lupus erythematosus react with plasmodial antigens and can inhibit the in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Autoimmunity*, 42(6), 545–552. <https://doi.org/10.1080/08916930903039810>
- Zevering, Y., Khamboonruang, C., Rungruengthanakit, K., Tunoviboonchai, L., Ruengpipattanapan, J., Bathurst, I., Barr, P., & Good, M. F. (1994). Life-spans of human T-cell responses to determinants from the circumsporozoite proteins of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(13), 6118–6122. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.13.6118>
- Zevering, Yinka, Amante, F., Smillie, A., Currier, J., Smith, G., Houghten, R. A., & Good, M. F. (1992). High frequency of malaria-specific T cells in non-exposed humans. *European Journal of Immunology*, 22(3), 689–696. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220311>
- Zhang, J., Liu, W., Wen, B., Xie, T., Tang, P., Hu, Y., Huang, L., Jin, K., Zhang, P., Liu, Z., Niu, L., & Qu, X. (2019). Circulating CXCR3+ Tfh cells positively correlate with neutralizing antibody responses in HCV-infected patients. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46533-w>
- Zhang, Y., Gallastegui, N., & Rosenblatt, J. D. (2015). Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *International Immunology*, 27(10), 521–530. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv034>
- Zhao, H., Bo, C., Kang, Y., & Li, H. (2017). What else can CD39 tell us? *Frontiers in Immunology*, 8(JUN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00727>
- Zheng, H., Tan, Z., & Xu, W. (2014). Immune evasion strategies of pre-erythrocytic malaria parasites. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/362605>
- Zimmerman, P. A. (2017). *Plasmodium vivax* infection in duffy-negative people in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3), 636–638. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0461>
- Zimmerman, P. A., Woolley, I., Masinde, G. L., Miller, S. M., Mcnamara, D. T., Hazlett, F., Mgone, C. S., Alpers, M. P., Genton, B., Boatman, B. A., & Kazura, J. W. (1999). Emergence of FY*A(null) in a *Plasmodium vivax*-endemic region of Papua New Guinea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13973–13977. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13973>