

ELIANA FERREIRA MONTEIRO

**Antigenicidade da proteína de superfície do merozoíto 1 de *Plasmodium malariae*,
Plasmodium vivax e *Plasmodium falciparum* em infecções naturais de humanos e
primatas não humanos em ensaio multiplex**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de Concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Karin Kirchgatter

São Paulo

2021

ELIANA FERREIRA MONTEIRO

**Antigenicidade da proteína de superfície do merozoíto 1 de *Plasmodium malariae*,
Plasmodium vivax e *Plasmodium falciparum* em infecções naturais de humanos e
primatas não humanos em ensaio multiplex**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Medicina Tropical

Área de Concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Karin Kirchgatter

(Versão Corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011. A versão original está
disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Monteiro, Eliana Ferreira

Antigenicidade da proteína de superfície do
merozoíto 1 de *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*
e *Plasmodium falciparum* em infecções naturais de
humanos e primatas não humanos em ensaio multiplex
/ Eliana Ferreira Monteiro. -- São Paulo, 2021.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Medicina Tropical. Área de
Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.
Orientadora: Karin Kirchgatter.

Descritores: 1. *Plasmodium malariae* 2. Sorologia
3. Proteínas recombinantes 4. Multiplex 5. Bio-plex
6. Malária 7. Monitoramento epidemiológico

USP/FM/DBD-258/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais Marilene e Elias dedico este trabalho como fruto de todo o incentivo a sempre buscar o conhecimento.

Às minhas irmãs Elaine e Edvânia com amor e carinho pela torcida.

Ao meu marido Gerônimo, com amor e gratidão pela paciência, parceria e apoio nas minhas decisões.

Ao meu filho Arthur que é a luz da minha vida, com muito amor dedico.

AGRADECIMENTOS

A vida é uma caixinha de surpresas! A proposta de encarar a realização de um Doutorado foi entregue para mim como um desafio inesperado, daqueles grandes e que dão frio na barriga. Esta sensação desafiadora foi a força motriz para chegar até aqui.

A trajetória não foi linear, e em muitos momentos contei com a ajuda de muitas pessoas. Por isso a lista de agradecimentos é extensa.

Começo agradecendo a Deus, por me dar forças e ânimo todos os dias. Me considero abençoada por ter minha família completa em tempos tão difíceis e de tantas perdas.

Agradeço à minha família:

- ❖ Aos meus pais Elias e Marilene por me ensinar que as conquistas chegam após muitas lutas, nada vem fácil. Minha mãe é o meu exemplo de mulher batalhadora, incansável, digna e honesta, avó dedicada, minha amiga, cúmplice e parceira, sempre me apoiou nas minhas decisões e me mostrou aquela “luz no fim do túnel” que por vezes eu não conseguia enxergar, por isso mãe sou extremamente grata a você;
- ❖ Às minhas irmãs Elaine e Edvânia, pois crescemos juntas com essa vontade de alcançar nossos objetivos, vocês são a minha melhor torcida!
- ❖ Ao meu marido Gerônimo por caminhar ao meu lado, pela compreensão ao ser privado, em muitos momentos, da minha companhia e atenção. Agradeço por seu amor, paciência, carinho, dedicação e cumplicidade. Você é meu amor e meu porto seguro!
- ❖ Ao meu filho Arthur, que chegou no meio dessa trajetória. Que me ensina diariamente a ser mãe, que me permitiu sentir o amor incondicional, você me fortalece... te amo!

Agradeço à minha orientadora e amiga Dra. Karin Kirchgatter por acreditar no meu potencial quando nem mesmo eu estava com essa certeza. Não me canso de te agradecer em todas as oportunidades que tenho kkkkk.... Você é muito especial para mim, sempre me ajudou e apoiou quando eu precisei (e foram muitas vezes), tanto na vida acadêmica quanto na vida pessoal, ampliou meus horizontes e me mostrou caminhos que eu desconhecia. Muito obrigada por tudo!!!

Agradeço aos meus amigos e parceiros de laboratório:

- ❖ À Dra. Lilian de Oliveira Guimarães pela paciência em me apresentar o “misterioso” mundo da Biologia Molecular lá no início da minha carreira, por compartilhar tantos conhecimentos diariamente e pela amizade;
- ❖ À Ms. Roseli de França Simões pela troca e experiências, por sua valorosa amizade e por sempre torcer por mim;
- ❖ Ao Biólogo Bruno da Silva Mathias pela ajuda na execução dos trabalhos na bancada, por ingressar em nossa equipe de laboratório quando eu mais estava precisando de ajuda. Valeu pelo socorro! Agradeço às boas risadas e à sua amizade. Obrigada pelos mapas lindos que compõem este trabalho, elaborados em parceria com a Bióloga Carolina Clares dos Anjos que contribuiu na elaboração de mapas muito bem executados que ilustram este trabalho. Carol você veio para acrescentar ao nosso time com sua energia, alegria, amizade e parceria, muito obrigada!!!

Agradeço aos colaboradores deste estudo:

- ❖ À pesquisadora Maria del Carmen Fernandez-Becerra, pela disponibilidade em vir ao Brasil compartilhar os seus valiosos conhecimentos;
- ❖ Ao professor Dr. Gerhard Wunderlich e ao professor Dr. Niels Olsen Câmara por me receberem em seus laboratórios e cederem espaço e equipamentos para a realização desta pesquisa;
- ❖ À Dra. Meire Ioshie Hiyane pela disposição em me auxiliar nas análises no equipamento BioPlex200, pelos ensinamentos e amizade;
- ❖ À Dra. Márcia Holcman (*in memoriam*) por todos os ensinamentos em estatística que contribuiu para as análises dos resultados deste projeto;
- ❖ A todos os colaboradores que de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a realização do presente estudo.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido através do processo no 2016/04559-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“O conhecimento é uma aventura sem fim no limite da incerteza.
A certeza encerra a investigação”

Jacob Bronowski

RESUMO

Monteiro EF. *Antigenicidade da proteína de superfície do merozoíto 1 de Plasmodium malariae, Plasmodium vivax e Plasmodium falciparum em infecções naturais de humanos e primatas não humanos em ensaio multiplex* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

No Brasil, quase todos os casos de malária ocorrem na Região Amazônica, onde predominam infecções causadas por *Plasmodium vivax*. Na Região Extra-Amazônica, a malária autóctone é causada por *P. vivax* ou *P. malariae*, em áreas de Mata Atlântica. Mundialmente, *P. malariae* apresenta ampla distribuição geográfica, em geral com parasitemias baixas e em coinfeções, dificultando seu diagnóstico e levando a uma taxa de prevalência subestimada. A Proteína de Superfície do Merozoíto 1 (MSP1), além de ser candidata à vacina contra a malária, é altamente imunogênica. Estudos para detecção de anticorpos contra proteínas recombinantes de *Plasmodium* são cada vez mais utilizados para mapear distribuição geográfica, soroprevalência e intensidade de transmissão de malária, mas nenhum levantamento soroepidemiológico, utilizando proteínas recombinantes de *P. malariae*, foi realizado no Brasil. Assim, neste trabalho foram utilizadas proteínas recombinantes da MSP1 de *P. malariae*, bem como de *P. falciparum* e *P. vivax*, para a detecção de anticorpos anti-MSP1 dessas espécies de parasitas em amostras de soros. A proteína GST (Glutathione S-transferase) e proteínas em fusão com GST representando diferentes regiões da MSP1 de *P. malariae* (PmMSP1_{F1}, PmMSP1_{F2}, PmMSP1_{F3}, PmMSP1_{F4} e PmMSP1₁₉), além das proteínas recombinantes da região C-terminal da MSP1 de *P. vivax* (PvMSP1₁₉) e *P. falciparum* (PfMSP1₁₉), foram utilizadas. Para determinação das respostas de IgG em soros de primatas não-humanos (PNHs) da Região Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado, e de humanos de três localidades, Região Amazônica (Ramal do Granada/AC e Porto Velho/RO) e Mata Atlântica (Intervales/SP), as proteínas foram covalentemente acopladas a *beads* carboxiladas e utilizadas em ensaios multiplex. Os resultados dos PNHs mostraram que cerca de 40% dos soros reconheceram as proteínas recombinantes de uma ou mais espécies de *Plasmodium*. Um número relativamente maior de soros reativos foi encontrado em animais da Mata Atlântica, possivelmente refletindo antiga circulação parasitária mais intensa entre os PNHs, devido à proximidade com humanos em uma densidade populacional mais elevada. Para os soros de humanos, a positividade foi de 69,5% para as amostras que reconheceram pelo menos uma proteína recombinante. O índice de reatividade para a porção C-terminal do *P. falciparum* foi significativamente maior em comparação com as outras proteínas recombinantes, seguido pela C-terminal de *P. vivax* e pela porção N-terminal de *P. malariae*. Entre as proteínas recombinantes de *P. malariae*, a porção N-terminal de *P. malariae* apresentou o maior índice de reatividade isoladamente. Nos humanos, os altos índices de reatividade de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes de *P. vivax* nas três localidades, *P. malariae* na região de Mata Atlântica, e *P. falciparum* na região Amazônica suportam a hipótese de que existe a frequente circulação dos parasitas em infecções assintomáticas. Este estudo valida o uso do ensaio multiplex para medir anticorpos IgG adquiridos naturalmente em humanos e símios contra proteínas MSP1 recombinantes de *P. malariae*. Nossos resultados também demonstram que essas proteínas são ferramentas importantes para levantamentos soroepidemiológicos, podendo ser utilizadas em programas de vigilância e eliminação da malária.

Descritores: *Plasmodium malariae*; Sorologia; Proteínas recombinantes; Multiplex; Bio-plex; Malária; Monitoramento epidemiológico.

ABSTRACT

Monteiro EF. *Antigenicity of merozoite surface protein 1 of Plasmodium malariae, Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum in natural infections of humans and non-human primates in multiplex assay* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

In Brazil, almost all malaria cases occur in the Amazon region, where infections caused by *Plasmodium vivax* predominate. In the Extra-Amazon Region, autochthonous malaria is caused by *P. vivax* or *P. malariae*, in Atlantic Forest areas. Worldwide, *P. malariae* has a wide geographic distribution, generally with low parasitemias and in coinfections, making its diagnosis difficult and leading to an underestimated prevalence rate. Merozoite Surface Protein 1 (MSP1), in addition to being a vaccine candidate against malaria, is highly immunogenic. Studies to detect antibodies against recombinant proteins from *Plasmodium* are increasingly used to map geographic distribution, seroprevalence and intensity of malaria transmission, but no seroepidemiological survey using recombinant proteins from *P. malariae* has been carried out in Brazil. Thus, in this work, recombinant proteins from *P. malariae* MSP1, as well as from *P. falciparum* and *P. vivax*, were used for the detection of anti-MSP1 antibodies of these species in serum samples. GST protein (Glutathione S-transferase) and GST fusion proteins representing different regions of *P. malariae* MSP1 (PmMSP1_{F1}, PmMSP1_{F2}, PmMSP1_{F3}, PmMSP1_{F4} and PmMSP1₁₉), in addition to recombinant proteins from the C-terminal region of *P. vivax* (PvMSP1₁₉) and *P. falciparum* (PfMSP1₁₉) were used. To determine IgG responses in sera from non-human primates (NHPs) from the Amazon Region, Atlantic Forest and Cerrado, and from humans from three localities, Amazon Region (Ramal do Granada/AC and Porto Velho/RO) and Atlantic Forest (Intervales/SP), the proteins were covalently coupled to carboxylated beads and used in multiplex assays. The results of the NHPs showed that about 40% of the sera recognized the recombinant proteins of one or more *Plasmodium* species. A relatively larger number of reactive sera were found in animals from the Atlantic Forest, possibly reflecting more intense former parasitic circulation among NHPs, due to the proximity to humans at a higher population density. For human sera, the positivity was 69.5% for samples that recognized at least one recombinant protein. The reactivity index for the C-terminal portion of *P. falciparum* was significantly higher compared to the other recombinant proteins, followed by the C-terminal portion of *P. vivax* and the N-terminal portion of *P. malariae*. Among the recombinant proteins of *P. malariae*, the N-terminal portion showed the highest rate of reactivity alone. In humans, the high levels of IgG antibody reactivity against *P. vivax* recombinant proteins in the three locations, *P. malariae* in the Atlantic Forest region, and *P. falciparum* in the Amazon region support the hypothesis that there is frequent circulation of these parasites in asymptomatic infections. This study validates the use of the multiplex assay to measure naturally acquired IgG antibodies against *P. malariae* recombinant MSP1 proteins in humans and NHPs. Our results also demonstrate that these proteins are important tools for seroepidemiological surveys and can be used in malaria surveillance and elimination programs.

Descriptors: *Plasmodium malariae*; Serology; Recombinant proteins; Multiplex; Bio-Plex; Malaria; Epidemiological monitoring.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. O complexo MSP-1 interagindo com as proteínas MSP-6, MSP-7. Esquema da clivagem da proteína MSP-1 durante a invasão dos eritrócitos. Adaptado de Holder e colaboradores (2009)21
- Figura 2. Mapa da área de estudo. Origem das amostras dos animais de Vida Livre (A) e Cativo (B).....27
- Figura 3. Comparação de seqüências de aminoácidos da MSP1 de 16 espécies de *Plasmodium*. A localização, o tamanho e a variabilidade de cada fragmento da PmMSP1 a ser estudado neste trabalho são representadas. Fonte: (GUIMARÃES et al., 2015).29
- Figura 4. Polimorfismo de aminoácidos nas seqüências de MSP1 de isolados de *P. malariae*/*P. brasilianum*. Em vermelho são mostrados os fragmentos utilizados para a produção das proteínas recombinantes. Em azul são destacados os aminoácidos obtidos nas seqüências de isolados de primatas não-humanos. O Fragmento 4 não está representado por ser monomórfico (GUIMARÃES et al., 2015).....30
- Figura 5. (A) As proteínas recombinantes foram submetidas a eletroforese de SDS-PAGE a 12% e coradas com Azul de Coomassie. a: Padrão de peso molecular (kDa), a: Padrão de peso molecular (Thermo /Fermentas, pesos em kDa), b: F1, c: F2, d: F3, e: F4, f: PmMSP119 e g: GST. (B) Western blot mostrando o reconhecimento de proteínas por um pool de soros de pacientes com *P. malariae*. b: F1, c: F2, d: F3, e: F4, f: PmMSP119 e g: GST.....36
- Figura 6. Análise da eficiência do acoplamento utilizando anticorpo IgG anti-GST nas amostras de PNH.38
- Figura 7. Porcentagem de soros positivos de primatas não humanos de vida livre (azul) e de cativos (vermelhos) para uma ou mais das proteínas recombinantes MSP1.41
- Figura 8. Porcentagem de soros positivos de primatas não-humanos de vida livre (A) e cativos (B) das regiões Amazônica (azul), Mata Atlântica (vermelha) e Cerrado (verde) para cada uma das proteínas recombinantes MSP1.....42
- Figura 9. Diagrama de Venn das amostras positivas contra antígenos de *Plasmodium malariae*.....42
- Figura 10. Soros reativos à região C-terminal de MSP1 das três espécies de *Plasmodium*, PmMSP1₁₉, PvMSP1₁₉ e PfMSP1₁₉. A) Diagrama de Venn de soros positivos para a MSP1 das três espécies de *Plasmodium*; B) Índice de Reatividade dos soros positivos para C-terminal. A linha vermelha representa o IR médio obtido para cada proteína recombinante e as barras de erro (pretas) representam o desvio padrão.43

- Figura 11. Frequência de animais de vida livre classificados em nível de gênero, com soros reativos à MSP1 recombinante de *Plasmodium*. (A) Animais da região amazônica, (B) Mata Atlântica e (C) Cerrado. As porcentagens calculadas de soros positivos são mostradas dentro das barras.44
- Figura 12. Frequência de animais em cativeiro com soros positivos para a MSP1 recombinante de *Plasmodium*, classificados em nível de gênero. (A) Animais da região amazônica, (B) Mata Atlântica.44
- Figura 13. Mapa de calor da soroprevalência expressa como índice de reatividade (IR) das diferentes espécies de PNHs reconhecendo as proteínas recombinantes das três espécies de *Plasmodium*.45
- Figura 14. Análise da eficiência do acoplamento das proteínas recombinantes nas amostras de humanos utilizando anti-GST biotilado. A) Comparação entre Singleplex e Multiplex somente dos controles de qualidade. B) MFI dos controles de qualidade do acoplamento.46
- Figura 15. Distribuição dos valores de MFI obtidos para as proteínas recombinantes de MSP1 de *P. malariae* (A-E), *P. vivax* (F) e *P. falciparum* (G). Os pontos representam o valor médio (média aritmética) de MFI das duplicatas dos controles negativos presentes em cada placa de ensaio. A linha horizontal (amarela) representa a média geométrica da MFI dos controles negativos acrescido de três desvios padrão (*cut-off*) de cada proteína recombinante.48
- Figura 16. Comparação dos valores individuais do Índice de Reatividade (IR) de anticorpos IgG em soros de indivíduos de P.E. Intervalos / SP, Ramal do Granada / AC e Porto Velho / RO. A) Porcentagem de soros reativos às proteínas MSP1 recombinantes em todo o conjunto de amostras (total); B) Comparação do conjunto de amostras (total) utilizando os valores individuais do Índice de Reatividade (IR) de anticorpos IgG contra diferentes proteínas MSP-1 recombinantes em soros de indivíduos expostos à malária; C-E) As amostras de soro foram testadas em duplicata no Multiplex a uma diluição de 1:100 contra proteínas recombinantes. A linha vermelha representa o IR médio obtido para cada proteína recombinante.50
- Figura 17. Respostas de anticorpos naturalmente adquiridos para antígenos PmMSP1₁₉, PvMSP1₁₉ e PfMSP1₁₉ recombinantes em três localidades (A). As porcentagens de soros positivos para múltiplas espécies de *Plasmodium* são mostradas para indivíduos da Região Amazônica (B) e da Mata Atlântica (C) para cada uma das proteínas recombinantes MSP1 reconhecidas em várias espécies, ou separadamente nas três localidades (D).51
- Figura 18. Mapa de calor exibindo o IR de cada proteína de *P. malariae* e os padrões de reconhecimento e combinações.52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras provenientes de Mantenedores de Fauna de área de Mata Atlântica.	28
Tabela 2. Características dos fragmentos utilizados neste estudo.	35
Tabela 3. Porcentagem de soros reativos (animais de vida livre e cativos, n = 495) para as proteínas recombinantes MSP1.	38
Tabela 4. Frequências absolutas e relativas de primatas não humanos de Vida Livre positivos por ensaio Bioplex por proteína MSP1	39
Tabela 5. Frequências absolutas e relativas de primatas não humanos Cativos positivos por ensaio Bioplex por proteína MSP1	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. A malária no Brasil	16
1.2. <i>Plasmodium malariae</i>	17
1.3. Malária simiana no Brasil	18
1.4. A imunidade e a malária	19
1.5. Proteína de Superfície do Merozoíto 1 – MSP1	20
1.5.1. MSP1 de <i>P. malariae</i> / <i>P. brasilianum</i>	21
1.5.2. Estudos de Imunogenicidade e Antigenicidade da MSP1 de <i>P. malariae</i> , <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	22
2. OBJETIVO.....	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Amostras utilizadas neste estudo	26
3.1.1. Origem das amostras de Primatas Não-Humanos (PNHs) de regiões endêmicas...26	
3.1.1.1. Amostras de PNHs de Vida Livre	26
3.1.1.2. Amostras de PNHs Cativos	27
3.1.2. Amostras de humanos de regiões endêmicas	28
3.2. Proteínas recombinantes	29
3.2.1. Isolamento dos fragmentos de <i>P. malariae</i>	29
3.2.2. Clonagem dos fragmentos de <i>P. malariae</i>	30
3.2.3. Preparo das Proteínas de Fusão	31
3.3. Acoplamento das proteínas recombinantes às <i>beads</i>	32
3.4. Avaliação de eficiência de acoplamento.....	32
3.5. Ensaio Multiplex de Proteínas recombinantes	33

3.6. Análise Estatística.....	33
3.7. Aspectos éticos	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Produção das proteínas recombinantes: Clonagem, expressão e purificação.....	35
4.2. Avaliação das proteínas recombinantes purificadas por ensaio de Western blot	36
4.3. Padronização dos Ensaio Multiplex com Proteínas recombinantes	36
4.4. Resultados do multiplex das amostras de primatas não-humanos (PNHs).....	37
4.4.1. Padronização dos ensaios e obtenção dos controles para PNHs	37
4.4.2. Avaliação da resposta imune contra MSP1 de PNHs	38
4.4.3. Histórico da exposição de PNHs à malária	43
4.5. Resultados do multiplex das amostras de humanos.....	46
4.5.1. Análise da eficiência de acoplamento de proteínas de fusão GST a <i>beads</i> magnéticas carboxiladas BioPlex.....	46
4.5.2. Determinação do <i>Cut-off</i>	47
4.5.3. Resposta de anticorpos naturalmente adquiridos	49
5. DISCUSSÃO.....	53
5.1. Discussão dos resultados obtidos para PNHs	53
5.1.1. Padronização dos ensaios Bioplex e teste de eficiência de acoplamento das proteínas recombinantes para PNH.....	53
5.1.2. Imunidade humoral naturalmente adquirida contra parasitas da malária em PNHs.....	53
5.2. Discussão dos resultados obtidos para amostras de humanos	56
6. CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
APÊNDICE A - Artigo publicado na revista <i>Pathogens</i> sob o título “Naturally Acquired Humoral Immunity against Malaria Parasites in Non-Human Primates from the Brazilian Amazon, Cerrado and Atlantic Forest”. Monteiro <i>et al.</i> , 2020.	73

APÊNDICE B - Artigo publicado na revista <i>Pathogens</i> sob o título “Antibody Profile Comparison against MSP1 Antigens of Multiple <i>Plasmodium</i> Species in Human Serum samples from Two Different Brazilian Populations Using a Multiplex Serological Assay	74
ANEXO A – Parecer de Aprovação do Comitê de Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical (CEUA/281A).....	75
ANEXO B – Carta de Aprovação do Adendo do Comitê de Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical (Adendo 60 - CEUA/281A)	76
ANEXO C – Autorização para atividades com finalidade científica. SISBIO 44751-5	77
ANEXO D – Parecer de Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH 020/2015).....	81

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa de grande impacto na população mundial. É causada por cinco espécies de parasitas do gênero *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*), e transmitida naturalmente através da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles* (TALAPKO *et al.*, 2019). Outras formas de transmissão acidental também podem ocorrer, através de transfusão de sangue contaminado com *Plasmodium* (KIRCHGATTER *et al.*, 2005; KITCHEN; CHIODINI, 2006).

Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde, mais da metade da população mundial vive em áreas de risco para malária. Em 2019 foram registrados 229 milhões de casos de malária, resultando em 409 mil mortes em todo o mundo, com maior incidência na África Subsaariana, principalmente entre crianças menores de 5 anos (WHO, 2020).

1.1. A malária no Brasil

No Brasil, a malária é causada por três espécies de parasitas: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae* (CARLOS *et al.*, 2019), entretanto aproximadamente 89,3% dos casos de malária são causados por *P. vivax* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Em 2020 foram registrados mais de 140 mil casos de malária no país, com 1.381 internações e 24 óbitos registrados pela doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A Região Amazônica concentra 99,9% dos casos de malária no Brasil, onde prevalecem os casos de malária causados por *P. vivax*, com incidência maior no sexo masculino. Em 2020 os municípios da região amazônica foram classificados de acordo com a Incidência Parasitária Anual (IPA), indicador que mensura o risco de se contrair malária, da seguinte forma: 29 municípios foram classificados como de alto risco (IPA \geq 50 casos/1.000 hab.), 47 de médio risco (IPA entre 10 e <50 casos/1.000 hab.), 54 de baixo risco (IPA entre 1 e 10 casos/1.000 habitantes) e 128 municípios de muito baixo risco (IPA < 1 casos/1.000 habitantes).

Na Região Extra-Amazônica, que concentra menos de 1% dos casos de malária no Brasil, são registrados casos autóctones todos os anos (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). Um estudo sorológico realizado em indivíduos da região de Mata Atlântica do Estado de São Paulo revelou a presença de anticorpos de estágio sanguíneo para diferentes variantes do *P.*

vivax ou do *P. malariae*, demonstrando que casos assintomáticos ou oligossintomáticos podem ser frequentes (CURADO *et al.*, 2006), permitindo a circulação do agente etiológico e produção de novos casos, uma vez que muitos destes indivíduos assintomáticos não são tratados, inclusive pelo desconhecimento de serem portadores da doença (MARQUES *et al.*, 2008). É importante ressaltar que a malária assintomática apresenta riscos à saúde da população, principalmente para indivíduos com o sistema imunológico debilitado (KIRCHGATTER *et al.*, 2005).

1.2. *Plasmodium malariae*

Plasmodium malariae é uma espécie negligenciada no âmbito global uma vez que dados sobre sua prevalência não estão completos ou prontamente disponíveis, e neste sentido estudos muito limitados foram realizados (KUMAR, 2019). Visando ter um melhor entendimento sobre a resposta imunológica de anticorpos naturalmente adquiridos para *P. malariae*, este estudo tem o enfoque voltado para esta espécie de *Plasmodium*.

A distribuição de *P. malariae* é esparsa e está presente em todas as regiões endêmicas para a malária (ANTINORI *et al.*, 2012). Entretanto, quando o diagnóstico é realizado por gota espessa devido à semelhança morfológica com *P. vivax*, comumente *P. malariae* é identificado equivocadamente, acarretando uma prevalência subestimada de *P. malariae*. No Brasil, estudos moleculares demonstraram que *P. malariae* é bem mais prevalente em comparação com a gota espessa (CAVASINI *et al.*, 2000; SCOPEL *et al.*, 2004).

O ciclo biológico do *P. malariae* é caracterizado pelo lento desenvolvimento no mosquito (15 dias) e no humano (15 dias no fígado e 72 horas na corrente sanguínea). Quando comparado aos demais plasmódios que afetam humanos, apresenta baixa parasitemia e pode persistir no indivíduo por longos períodos (ANTINORI *et al.*, 2012), de forma assintomática, podendo apresentar complicações à saúde do indivíduo após décadas sem ser percebido pelo organismo (VINETZ *et al.*, 1998). Diferente do que acontece em infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*, não há evidências da presença de formas latentes (hipnozoítos) no fígado em infecções causadas por *P. malariae* (COLLINS; JEFFERY, 2007).

Estudos apontam o *P. malariae* como um dos mais antigos parasitas causadores da malária. O sucesso adaptativo é característico do lento ciclo biológico que favorece sua sobrevivência por longos períodos no organismo do hospedeiro sem ser notado, pois é

relativamente pouco inconveniente, podendo provocar futuras crises de recrudescência (COATNEY *et al.*, 1971).

1.3. Malária simiana no Brasil

Em 1992, o pesquisador Leônidas Deane visualizou a presença de *Plasmodium* em 10,1% dos 3472 macacos analisados na Região Amazônica, sendo todos positivos para *P. brasilianum* e 0,9% *Plasmodium* sp. Na região de Mata Atlântica localizada no sudeste do país, a prevalência de *Plasmodium* foi de 35,6% em 764 macacos, sendo 56% *P. brasilianum*, 47% *P. simium* e 6,6% *Plasmodium* sp. (DEANE, 1992).

Há evidências moleculares de que *P. malariae* pode ser derivado de *P. brasilianum*, um parasita que afeta primatas não-humanos do novo mundo, ou vice-versa (GUIMARÃES *et al.*, 2012; LAL *et al.*, 1988; TAZI; AYALA, 2011). Dados presentes na literatura sugerem que *P. malariae*/*P. brasilianum* são idênticos (COATNEY *et al.*, 1971; GUIMARÃES *et al.*, 2012), sendo geneticamente indistinguíveis (ESCALANTE; BARRIO; AYALA, 1995). Ainda, estudos sorológicos demonstram reatividade cruzada de anticorpos de *P. malariae* reativos a epítomos de *P. brasilianum* (COCHRANE; COLLINS; NUSSENZWEIG, 1984).

Plasmodium simium é morfológica e geneticamente indistinguível de *P. vivax* (DEANE, 1992; LECLERC *et al.*, 2004; LIM; TAZI; AYALA, 2005). Evidências recentes apresentadas por BRASIL e colaboradores (2017) mostraram a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) capazes de diferenciar *P. simium* de *P. vivax*, mas ainda não implicam a separação em duas espécies diferentes.

P. simium foi originalmente descrito em primatas não-humanos de São Paulo, sudeste do Brasil (FONSECA, 1951), e posteriormente encontrado em dois gêneros da família Atelidae: bugios (*Alouatta caraya* e *A. clamitans*) e mono-carvoeiro (*Brachyteles arachnoides*) (DEANE, 1992). Mais recentemente, infecções naturais por *P. simium* também foram descritas em macacos-prego (espécies *Cebus* e *Sapajus* da subfamília Cebinae da família Cebidae) (ALVARENGA *et al.*, 2015) e no macaco sauá *Callicebus nigrifrons* (Callicebinae subfamília da família Pitheciidae) (BUENO, 2012) da Mata Atlântica do Brasil.

1.4. A imunidade e a malária

Após anos de exposição ao parasita da malária, indivíduos desenvolvem progressivamente uma imunidade parcial (conhecida como premunição) caracterizada pela baixa carga parasitária, que é perdida rapidamente na ausência da transmissão (SERGENT; PARROT, 1935). O fator que permite que estes parasitas persistam durante o estado de premunição ainda é desconhecido, mas é sugerido que mecanismos imunossupressores que regulam a resposta imune protetora possam levar à persistência destes parasitas (HANSEN; SCHOFIELD, 2010).

A imunidade naturalmente adquirida contra a malária foi relatada pela primeira vez por Robert Koch (1900, apud DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD, 2009). Dados sobre a malária no mundo evidenciam que em indivíduos que são residentes de áreas endêmicas para malária com transmissão perene, a prevalência de casos e o número de ataques clínicos decaem, assim como o risco de morte, conforme aumenta a idade do indivíduo (WHO, 2012).

Sabe-se que durante as infecções maláricas as células T CD4⁺ atuam na resposta imune inata através da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Th1) e anti-inflamatórias (Th2) que desempenham um papel decisivo. Citocinas pró-inflamatórias (tais como IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-12 e IL-18) quando liberadas no início da infecção contribuem para o controle da doença, no entanto, para isto a resposta Th1 deve ser contrabalanceada pelas citocinas anti-inflamatórias Th2 (tais como IL-4, IL-10 e TGF- β), a fim de evitar os efeitos patológicos da infecção, mediando a resposta protetora (YAZDANI *et al.*, 2006).

A imunoregulação é realizada pelos linfócitos T reguladores (T_{reg}). Estas células são caracterizadas por expressar altos níveis de CD4⁺ e CD25⁺ em sua superfície e produzir citocinas imunossupressoras, tais como IL-10 e TGF- β . Estas citocinas liberadas pelas células T_{reg} agem como mecanismos supressores da resposta celular mediada por Th1 (Linfócito T helper 1), evitando uma resposta exacerbada devido a reações de hipersensibilidade e protegendo o indivíduo da malária grave. Por outro lado, tem sido postulado que esta linhagem imunoregulatória de células T_{reg} impede o desenvolvimento de células de memória (Th1) podendo limitar a indução da imunidade para a malária (HANSEN; SCHOFIELD, 2010).

Em uma infecção primária, as células T_{reg} realizam o controle da população de células de memória Th1 e evitam a remoção total dos parasitas, promovendo baixos níveis de uma parasitemia persistente (malária assintomática). Entretanto, sugere-se que isto contribui para a manutenção da memória imunológica e protege da malária grave em uma reinfeção (FINNEY; RILEY; WALTHER, 2010; SCHOLZEN; MINIGO; PLEBANSKI, 2010).

Durante a fase sanguínea / eritrocítica, a resposta imune intata é comandada principalmente pelos macrófagos que desempenham um importante papel, pois fagocitam eritrócitos infectados mesmo na ausência de anticorpos opsonizantes específicos para a malária. Após a liberação dos merozoítos na circulação inicia-se a invasão dos eritrócitos, havendo uma interação entre os receptores da célula e as proteínas de invasão do parasita, tais como MSP1 a MSP9, e AMA-1. Uma vez que as hemácias são incapazes de apresentar antígenos e as proteínas do parasita ficarem expostas por um curto espaço de tempo, consideram-se os anticorpos como as principais moléculas da imunidade naturalmente adquirida para o estágio eritrocítico da infecção malárica (MARSH; KINYANJUI, 2006; YAZDANI *et al.*, 2006).

1.5. Proteína de Superfície do Merozoíto 1 – MSP1

A proteína MSP1 (*Merozoite Surface Protein 1*) foi inicialmente identificada na superfície do merozoíto de *P. falciparum* (HOLDER; FREEMAN, 1982). É uma proteína de alto peso molecular sintetizada durante a maturação do esquizonte, podendo ser encontrada no estágio sanguíneo das diversas espécies de *Plasmodium* (BLACKMAN, Michael, 2000), e parece ser essencial para o processo de invasão do eritrócito (MCBRIDE; HEIDRICH, 1987). Por esta razão ela é uma das mais pesquisadas e uma promissora candidata ao desenvolvimento de uma vacina contra as formas do estágio eritrocítico (PLANSON; GUIJARRO; CHAFFOTTE, 2013; SOARES; RODRIGUES, 2002).

A MSP1 é ligada à superfície dos merozoítos por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Conforme esquematizado na figura 1, esta proteína sofre um processamento proteolítico primário durante o processo de invasão, e é clivada em quatro fragmentos distintos: MSP1₈₃, MSP1₃₀, MSP1₃₈ e MSP1₄₂. Este último fragmento de 42 KDa sofre um segundo processamento no momento da invasão de um novo eritrócito, dando origem à MSP1₃₃ e MSP1₁₉. O fragmento de 33 KDa correspondente à porção N-terminal

(MSP1₃₃) é liberado imediatamente após a clivagem secundária, enquanto o fragmento de 19 KDa correspondente à porção C-terminal (MSP1₁₉) permanece ligado à superfície do parasita através da âncora de GPI e dessa forma é transportado para o interior do eritrócito (BLACKMAN, 2000; BLACKMAN *et al.*, 1990). Vários estudos têm sido realizados mostrando o potencial da MSP1 como alvo de vacinas, tanto para *P. falciparum* (HOLDER *et al.*, 1999) como em *P. vivax* (LONGACRE; MENDIS; DAVID, 1994).

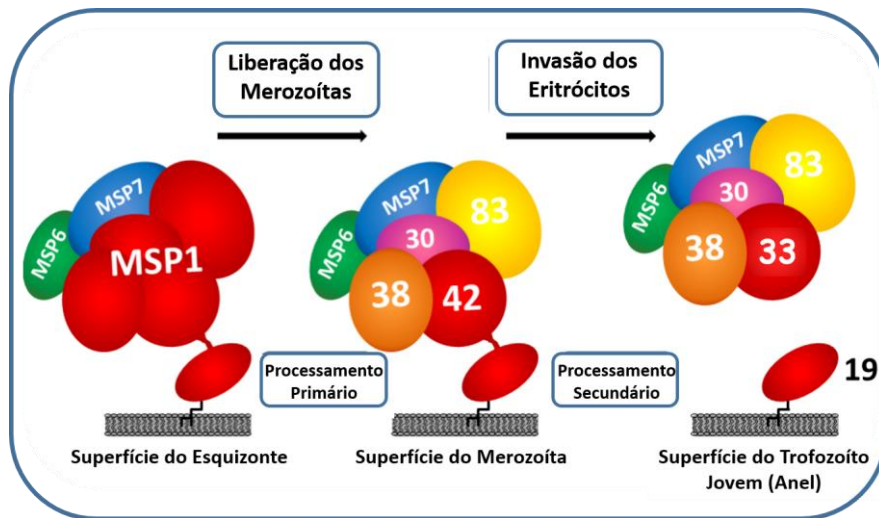


Figura 1. O complexo MSP-1 interagindo com as proteínas MSP-6, MSP-7. Esquema da clivagem da proteína MSP-1 durante a invasão dos eritrócitos. Adaptado de Holder e colaboradores (2009)

1.5.1. MSP1 de *P. malariae*/*P. brasilianum*

BIRKENMEYER e colaboradores (2010) mostraram que o gene da PmMSP1 (*Merozoite Surface Protein 1* de *P. malariae*) codifica uma proteína de 1751 aminoácidos, com uma sequência de 19 aminoácidos de peptídeo sinal. Através de sequenciamento e análises filogenéticas, também foi possível constatar que as sequências genéticas de MSP1 de *P. malariae* e *P. ovale* codificam proteínas com domínios conservados entre as espécies, entretanto não são variantes de outros plasmódios, mas verdadeiramente únicas dentro do gênero *Plasmodium*.

Dois estudos analisaram sequências nucleotídicas de regiões da porção N-terminal da MSP1 em diferentes isolados de *P. malariae*/ *P. brasilianum*. O primeiro, realizado em 2000, por FANDEUR e colaboradores, examinou uma pequena fração (261 bp) em um isolado de *P.*

malariae e quatro isolados de *P. brasilianum* da Guiana Francesa. As sequências de *P. brasilianum* mostraram um polimorfismo limitado, com uma única substituição de aminoácido em duas amostras e uma deleção de 24 bp em uma delas. Não houve qualquer polimorfismo em dois dos isolados de *P. brasilianum* e no isolado de *P. malariae*. O estudo de ARAÚJO e colaboradores (2013) analisou uma região um pouco maior (~600bp) em infecções causadas por *P. brasilianum* em sete primatas não-humanos do Estado de Rondônia, obtendo 98% de identidade entre elas e 93% de identidade com a sequência do isolado MM1 de Camarões.

Mais recentemente, nosso grupo analisou 60% do gene que codifica a MSP1 (~3000 bp), principalmente as regiões supostamente polimórficas, de isolados de *P. malariae/ P. brasilianum* de diferentes regiões geográficas e hospedeiros (GUIMARÃES *et al.*, 2015). As regiões gênicas analisadas foram divididas em cinco fragmentos (F1 a F5) que cobrem do bloco 3 ao 17 da PfMSP1. Exceto para uma região (F4), todas as sequências obtidas foram diferentes da única sequência já publicada (MM1A), encontrada em um paciente de Camarões (BIRKENMEYER *et al.*, 2010). Como esperado, a região mais polimórfica foi encontrada em F2, já conhecida por incluir *repeats* imperfeitos (BIRKENMEYER *et al.*, 2010). Nesta região, as sequências mais divergentes (89% de identidade) foram encontradas entre aquelas obtidas de amostras de símios e humanos (GUIMARÃES *et al.*, 2015). Interessantemente, a análise filogenética demonstrou agrupamento das sequências de acordo com sua origem geográfica e hospedeiro (GUIMARÃES *et al.*, 2015). Entretanto, novas análises (com esses e outros isolados) utilizando outras abordagens genéticas são importantes para caracterizar a epidemiologia dos isolados de *P. malariae/ P. brasilianum* em maior resolução.

1.5.2. Estudos de Imunogenicidade e Antigenicidade da MSP1 de *P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum*

A maioria dos estudos sobre vacinas de MSP1 tem como foco a região conservada C-terminal, tanto MSP1₄₂ como MSP1₁₉. Estudos demonstraram que anticorpos anti-MSP1₄₂, anti-MSP1₃₃ e anti-MSP1₁₉ podem ser detectados na maior parte das amostras de pacientes com malária, indicando que MSP1 é um antígeno imunodominante e pode ser útil no desenvolvimento de uma vacina contra malária ou em triagem soropidemiológica (CHEONG *et al.*, 2013; MUERHOFF *et al.*, 2010; SOARES *et al.*, 1997).

Uma região localizada na porção N-terminal de PfMSP1, conhecida como Bloco 2 é, de longe, a região mais polimórfica da molécula em *P. falciparum*, com centenas de sequências variantes conhecidas a partir de vários isolados de parasitas (JIANG *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 1993). Vários estudos soroepidemiológicos têm mostrado que anticorpos para o Bloco 2 estão associados com um risco reduzido de episódios clínicos de malária (CAVANAGH *et al.*, 2004; CONWAY *et al.*, 2000; MAWILI-MBOUMBA *et al.*, 2003; POLLEY *et al.*, 2003). PfMSP1 Bloco 2 formulada com Alum e fusionada com GST foi imunogênica em camundongos (CAVANAGH; MCBRIDE, 1997). Uma construção sintética do Bloco 2 de PfMSP1 baseada em todas as variantes polimórficas encontradas em isolados naturais, combinada com o relativamente conservado Bloco 1 foi imunogênica em animais experimentais (COWAN *et al.*, 2011). A imunização de macacos *Aotus lemurinus griseimembra* com proteína a do Bloco-2 em fusão com GST induziu proteção imunológica contra a infecção pelo parasita em dois dos quatro animais imunizados (CAVANAGH *et al.*, 2004).

A proteína recombinante PvMSP1₁₉ fusionada com dois epítomos T auxiliares de PvMSP1₃₃ foi testada quanto à imunogenicidade em macacos *Callithrix jacchus* (ROSA, 2006). A PvMSP1₁₉ também foi testada em combinação com PvDBPII em camundongos. A imunização com a combinação de PvDBPII/PvMSP1₁₉ formulada com o Montanide ISA 720 induziu respostas de anticorpos de elevado título contra ambos os antígenos (DEVI *et al.*, 2007).

Recentemente um estudo demonstrou que os anticorpos IgG para a proteína recombinante MSP1₁₉ são espécie-específicos, não ocorrendo reatividade cruzada entre *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* (AMANFO *et al.*, 2016). Isso indica que, na elaboração de uma vacina multivalente, a MSP1 de *P. malariae* também deve ser incluída como componente. Além disso, a PmMSP1₁₉ pode ser um bom antígeno para estudar a soroprevalência de espécies *P. malariae*.

Estudos realizados com indivíduos de área endêmica no norte do Brasil mostraram a presença de anticorpos no soro capazes de reconhecer MSP1 recombinante de *P. vivax* (PvMSP1) (SOARES *et al.*, 1997, SOARES *et al.*, 1999), e a existência de determinantes antigênicos específicos de PvMSP1 sendo reconhecidos por anticorpos de *P. falciparum* (DEL PORTILLO *et al.*, 1992). Em amostras desta mesma região, observou-se uma associação de proteção clínica devido à presença de anticorpos no soro contra PvMSP1,

entretanto estes anticorpos eram somente contra a região N-terminal de MSP1 e não C-terminal, embora esta última porção seja considerada a mais imunogênica (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

Em 2010, um estudo realizado com poucos isolados provenientes de humanos de origem geográfica desconhecida avaliou a utilização de uma PmMSP1₁₉ recombinante como antígeno para ensaios sorológicos (MUERHOFF *et al.*, 2010). Esse estudo comparou os resultados de um teste ELISA comercial para detecção de anticorpos contra *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* com ELISAs *in house* que utilizavam também a MSP1₁₉ de *P. malariae* e *P. ovale*. Os resultados mostraram que apenas a proteína recombinante derivada da espécie infectante foi capaz de detectar 100% das infecções. Esse mesmo estudo analisou a resposta de macacos experimentalmente infectados (com *P. falciparum*) contra a PmMSP1₁₉ recombinante e nenhuma reatividade foi observada (MUERHOFF *et al.*, 2010). Essa reatividade foi encontrada elevada (título de IgG $\geq 16,384$) apenas em chimpanzés infectados experimentalmente com *P. malariae* (MUERHOFF *et al.*, 2010). Entretanto, até o momento, não existe nenhum estudo sorológico realizado com macacos naturalmente infectados com *P. brasilianum*.

Embora a sequência da MSP1 de *Plasmodium malariae* (PmMSP1) tenha sido a última a ser descrita (BIRKENMEYER *et al.*, 2010), polimorfismos nesta proteína em diferentes isolados de diferentes regiões endêmicas têm sido encontrados (ARAÚJO *et al.*, 2013; FANDEUR *et al.*, 2000; GUIMARÃES *et al.*, 2015). Entretanto, embora já existam alguns estudos utilizando a MSP1 de *P. malariae*, nenhum inquérito soropidemiológico foi realizado no Brasil, deixando lacunas em relação à sua ocorrência.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a resposta de anticorpos contra a MSP1 de *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* em soros de humanos e primatas não-humanos através de ensaio Bioplex.

2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Desenvolver ensaio de Bioplex *in house* com proteínas recombinantes baseadas na MSP1 de *P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum*;
- ❖ Padronizar o ensaio de Bioplex para uso com soros humanos e de primatas não-humanos;
- ❖ Avaliar a presença de anticorpos contra sete proteínas recombinantes representando cinco diferentes regiões da MSP1 de *P. malariae* (PmMSP1_{F1}, PmMSP1_{F2}, PmMSP1_{F3}, PmMSP1_{F4} e PmMSP1₁₉), e a região C-terminal da MSP1 de *P. vivax* (PmMSP1₁₉) e *P. falciparum* (PmMSP1₁₉) em soros humanos e de primatas não-humanos através da utilização da metodologia de Bioplex;
- ❖ Estimar os níveis de exposição a *P. malariae/P. brasilianum*, *P. vivax* e *P. falciparum* em humanos e primatas não-humanos provenientes da Mata Atlântica, Região Amazônica e Cerrado, classificando os respondedores de acordo com os níveis de anticorpos contra as proteínas recombinantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras utilizadas neste estudo

3.1.1. Origem das amostras de Primatas Não-Humanos (PNHs) de regiões endêmicas

As amostras de soro/plasma de primatas não-humanos têm como origem a Região Amazônica, Mata Atlântica e a região do Cerrado. Estas amostras fazem parte de dois grupos: são 373 amostras de animais de vida livre e 122 de animais de cativeiro, mostrados na figura 2.

3.1.1.1. Amostras de PNHs de Vida Livre

As amostras dos PNHs de vida livre têm como origem três regiões brasileiras: Região Amazônica, Mata Atlântica e a região do Cerrado (Figura 2A).

Os soros / plasmas dos animais de Vida Livre da Região Amazônica (n=155) são provenientes de localidades distintas, sendo: o município de Boca do Acre, localizado no interior do Estado do Amazonas (AM), município de Abunã no Estado de Rondônia (RO), Porto Velho (RO) (construção de duas Usinas hidrelétricas (UHEs) no Rio Madeira - Jirau e Santo Antônio), Pimenta Bueno (construção de uma Pequena Central Hidrelétrica – PCH no Rio Machado – Rondon II), Machadinho D'Oeste (antiga área de extração de borracha), mancha florestal preservada de grandes monoculturas de soja em Cabixi (RO), e ao longo da rodovia BR-319 (Rodovia Manaus (AM) -Porto Velho (RO)). Estas coletas ocorreram de março de 2009 a novembro de 2012, durante projetos relacionados à gestão ambiental, envolvendo o manejo de animais (ARAÚJO *et al.*, 2013; BUENO *et al.*, 2013).

As amostras dos animais de Vida Livre da Mata Atlântica (n=111) são originárias de áreas urbanas e fragmentos florestais do entorno do município de São Paulo (Cantareira, Parelheiros, Grajaú, às margens das represas Billings e Guarapiranga), que pertencem a coletas realizadas de outubro de 1997 a julho de 2005 (DUARTE *et al.*, 2008), e do município de Indaial (Centro de Pesquisas Biológicas) no Estado de Santa Catarina, de junho de 2001 a fevereiro de 2015.

Já as amostras do Cerrado (n=107) foram coletadas de abril de 2000 a março de 2001, na área localizada na margem direita de um lago formado pela barragem do Rio Paraná na área do reservatório da Usina Hidrelétrica Engenheiro Sérgio Motta (HEP), também conhecida como UHE Porto Primavera, na divisa entre os Estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul (DUARTE *et al.*, 2006), e de janeiro a dezembro de 2009 as amostras foram coletadas previamente a construção de uma Pequena Central Hidrelétrica (PCH) localizada entre os Municípios de São Joaquim da Barra e Guará, Região de Cerrado, no nordeste do estado de São Paulo.

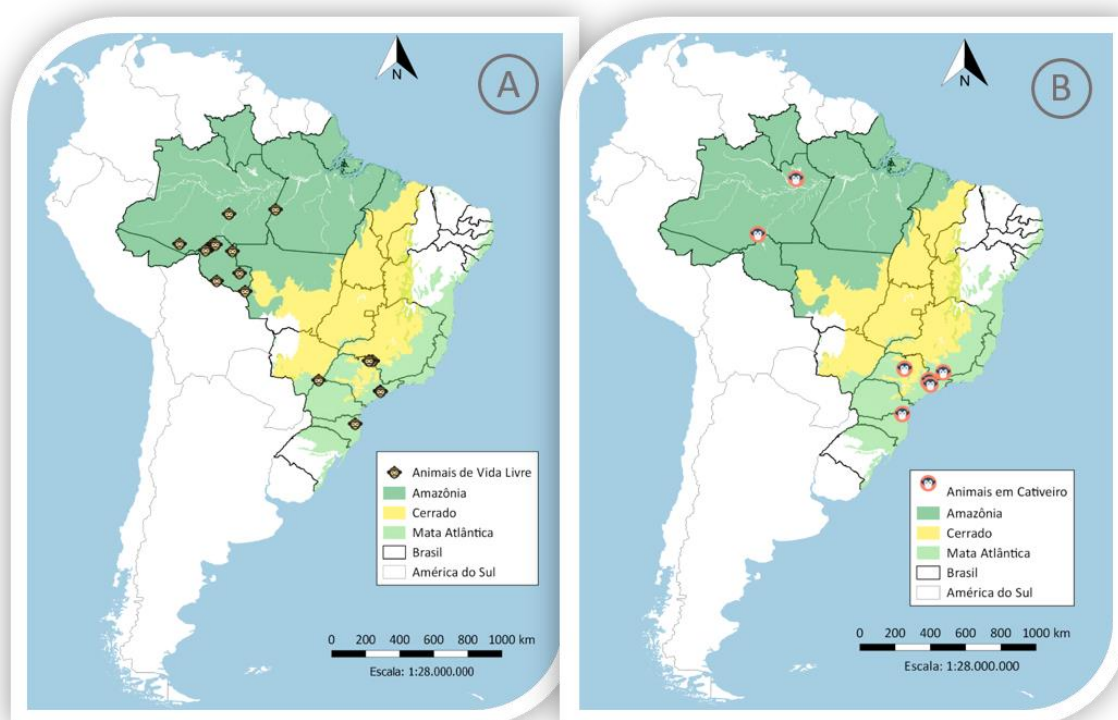


Figura 2. Mapa da área de estudo. Origem das amostras dos animais de Vida Livre (A) e Cativeiro (B).

3.1.1.2. Amostras de PNHs Cativos

As amostras dos animais de Cativeiro são originárias de duas regiões brasileiras: Região Amazônica e Mata Atlântica (Figura 2B).

Os soros / plasma de PNHs coletados na Região Amazônica (n=19) são de animais que eram mantidos próximos das áreas de habitação humana, como os do Parque Ecológico de Porto Velho, e animais apreendidos pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e

dos Recursos Naturais Renováveis), que na maioria das vezes foram mantidos em residências de cidades, como animais de estimação, em áreas rurais ou periféricas. Já as amostras dos animais da Mata Atlântica (n=103) são originários de Mantenedores de Fauna (tabela 1).

Tabela 1. Amostras provenientes de Mantenedores de Fauna de área de Mata Atlântica.

Mantenedor	N
Zoológico de São Paulo	60
Parque Ecológico do Tietê	31
CETAS Lorena	08
Zoológico de Bauru	01
CETAS Unimonte (São Vicente)	01
Centro de Pesquisas Biológicas - Indaial/SC	02
Total	103

3.1.2. Amostras de humanos de regiões endêmicas

As amostras de soro/plasma humano foram obtidas de diferentes regiões endêmicas do Brasil nas quais a presença de *P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum* têm sido demonstradas. Como controle negativo, foram utilizadas duplicatas de oito soros de indivíduos que não estiveram em áreas de transmissão de malária.

Os soros da Região Amazônica foram recebidos de duas localidades diferentes na Amazônia Ocidental Brasileira: (i) 238 amostras de um estudo de coorte de base populacional em andamento realizado em um assentamento agrícola (Ramal do Granada, Acrelândia, estado do Acre), coletadas em Março de 2004 a maio de 2005 (SILVA-NUNES *et al.*, 2006); (ii) 52 amostras de uma população situada às margens do Rio Madeira, região ribeirinha de Porto Velho, capital do estado de Rondônia, coletadas de 2006 a 2008 (MEDEIROS *et al.*, 2013). Como em outras configurações endêmicas no Brasil, a maioria dos casos de malária nessas áreas é causada por *P. vivax* (CARLOS *et al.*, 2019).

Os soros da Mata Atlântica foram coletados no Parque Estadual Intervales (126 amostras), distrito de Guapiara, Estado de São Paulo, em janeiro de 2002 (CURADO *et al.*, 2006). Esta área do Vale do Ribeira e áreas costeiras do Estado de São Paulo relataram prevalência de malária por *P. vivax* e poucas, mas não insignificantes, infecções por *P. malariae* (CARLOS *et al.*, 2019).

3.2. Proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes das região C-terminal da MSP1 de *P. vivax* (PvMSP1₁₉) e *P. falciparum* (PvMSP1₁₉) utilizadas neste estudo foram obtidas em pesquisas anteriores e gentilmente cedidas para a realização deste estudo (DE OLIVEIRA *et al.*, 1999; MEDEIROS *et al.*, 2013).

Os fragmentos da MSP1 de *P. malariae* e as cinco proteínas recombinantes (PmMSP1_{F1}, PmMSP1_{F2}, PmMSP1_{F3}, PmMSP1_{F4} e PmMSP1₁₉) foram produzidas em estudos anteriores do nosso grupo (GUIMARÃES *et al.*, 2015; ELIZARDEZ *et al.*, 2019), conforme detalhado nos próximos tópicos.

3.2.1. Isolamento dos fragmentos de *P. malariae*

Os fragmentos de MSP1 de *Plasmodium malariae* (PmMSP1) foram obtidos em estudo anterior, que analisou a presença de polimorfismos no gene codificador desta proteína em amostras brasileiras de *P. malariae*/*P. brasilianum*, conforme ilustrado na figura 3. Cinco sequências provenientes do isolado I11 foram incluídas neste trabalho (uma por região), para a produção das proteínas de fusão. As regiões diferem quanto à variabilidade de sequência encontrada entre os isolados analisados (Figura 4) (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

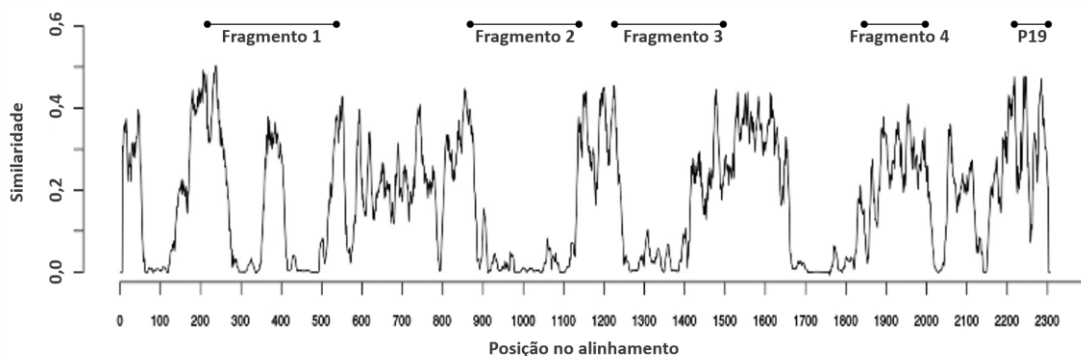


Figura 3. Comparação de sequências de aminoácidos da MSP1 de 16 espécies de *Plasmodium*. A localização, o tamanho e a variabilidade de cada fragmento da PmMSP1 a ser estudado neste trabalho são representadas. Fonte: (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

Cycle Sequencing Kit, para a confirmação da presença dos fragmentos de interesse que foram submetidos à clonagem para confirmação da fase de leitura, permitindo realizar com segurança a expressão das proteínas de fusão (ELIZARDEZ *et al.*, 2019).

3.2.3. Preparo das Proteínas de Fusão

O preparo das proteínas de fusão foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Gerhard Wunderlich do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

A transformação das células competentes de *Escherichia coli* (cepa BL21 (DE3)) foi realizada com a utilização do plasmídeo recombinante conforme protocolo estabelecido (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As células competentes transformadas foram crescidas em meio LB por 10 minutos a 37°C, plaqueadas em meio LB-Ágar-amp com cloranfenicol e crescidas por 16 horas a 37°C.

As colônias de *E. coli* (BL21 (DE3)) transformadas com o plasmídeo recombinante (pGEX-3Y+inserto) foram repicadas em 5 mL do meio LB-Glucose 2% (+Amp, +Cloranfenicol) e crescidas à 37°C com homogeneização constante por aproximadamente 16 horas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As culturas de bactérias contendo o plasmídeo recombinante foram crescidas até atingir uma DO₆₀₀ de 0,6. A expressão das proteínas recombinantes fusionadas à GST (Glutathione-S-Transferase) foi induzida com a adição de 0,2 mM de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) à cultura de bactérias contendo o plasmídeo recombinante. A cultura foi então deixada à temperatura ambiente sob constante agitação durante 3 horas. As bactérias foram centrifugadas e ressuspendidas com PBS contendo 1% de Triton X-100, incubadas por 5 minutos com 40 μL de lisozima (0,1mg/mL), após sofrerem um ciclo de congelamento e descongelamento, foram agitadas em sonicador 2 vezes (potência 40 por 1 minuto) e centrifugadas por 15 minutos à 4°C. As proteínas de fusão com GST e a GST isoladamente foram purificadas com Glutathione-Sepharose 4B (GE healthcare). A pureza das proteínas foi analisada através da eletroforese das proteínas com gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e a concentração determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A identidade e a especificidade das proteínas recombinantes foram analisadas por Western blot através de um *pool* de soros policlonais de pacientes positivos para *P. malariae*

confirmados por PCR, e como controle negativo foram usados soro de indivíduos saudáveis. A especificidade de 100% também foi demonstrada ao observar que as proteínas recombinantes não foram reconhecidas por anticorpos de outras doenças não relacionadas com a malária (ELIZARDEZ *et al.*, 2019).

3.3. Acoplamento das proteínas recombinantes às *beads*

Com as proteínas recombinantes prontas, foi realizado o acoplamento dessas proteínas às *beads* magnéticas carboxiladas BioPlex (BioRad), que foram covalentemente revestidas através do uso do kit de acoplamento Bio-plex amine coupling (Bio-Rad), conforme instruções do fabricante.

Resumidamente, $1,25 \times 10^6$ *beads* foram ressuspensas em 100 μ L de PBS e incubadas com 1 μ g de cada uma das proteínas recombinante em reações independentes. A incubação foi feita a 4°C sob constante agitação durante a noite. As *beads* acopladas foram lavadas com 500 μ l de PBS pH 7,4, após a lavagem foram ressuspensas em 125 μ l de tampão de bloqueio e posterior incubação sob rotação à temperatura ambiente por 30 min. Seguido a isso, as *beads* foram lavadas com 250 μ l de tampão de armazenamento e centrifugadas por seis minutos a 14.000 rpm. As *beads* acopladas foram ressuspensas em 125 μ l do mesmo tampão e armazenados a 4° C protegidos da luz até o uso. A determinação da concentração das *beads* foi realizada através da contagem em Câmara de Neubauer no microscópio óptico com aumento de 400x.

3.4. Avaliação de eficiência de acoplamento

Para avaliar a eficiência do acoplamento das *beads* às nossas proteínas recombinantes de MSP1 de *Plasmodium* spp. (GST-MSP1), os ensaios multiplex foram realizados usando um anticorpo IgG policlonal de coelho anti-GST (Biotina) (Abcam, Cambridge, MA, EUA) para detectar proteína de fusão acoplada às *beads*.

O controle de acoplamento das proteínas recombinantes acompanhou todas as placas. A diluição do anticorpo anti-GST foi de 1:1000 em tampão de ensaio (PBS 1x, BSA 1%, Tween 20 0,02%) (50 μ L / poço). O anticorpo anti-GST ligado foi detectado com

estreptavidina marcada com R-ficoeritrina e a fluorescência foi medida no instrumento BioPlex 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) como descrito acima.

3.5. Ensaio Multiplex de Proteínas recombinantes

O ensaio multiplex com *beads* (MBA) utilizando as proteínas recombinantes foi realizado em colaboração com a Dra. Maria del Carmen Fernandez-Becerra (Assistant Research Professor) do Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal), antigo Centro de Investigación en Salud Internacional de Barcelona (CRESIB), e Germans Trias i Pujol Health Science Research Institute (IGTP), ambos na Espanha. Os ensaios foram realizados no equipamento multiusuário, localizado no laboratório do Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Em cada ensaio utilizamos 2000 *beads* revestidas com as sete proteínas recombinantes e a GST isolada, que foram incubadas com nossas amostras de soro/plasma em diluições 1:100 e deixadas sob agitação por 1 hora no escuro. Seguimos para a segunda incubação, onde foi adicionado o anticorpo de detecção IgG biotilado sendo as *beads* deixadas sob agitação por 1 hora no escuro; após duas lavagens com PBS foi adicionada ficoeritrina conjugada com estreptavidina e deixada por 10 minutos, seguida de duas lavagens com PBS. As *beads* foram ressuspensas em 125 µL de tampão de ensaio (PBS 1x, BSA 1%, Tween 20 0,02%) e analisadas no equipamento BioPlex 200 onde os resultados são expressos através da intensidade de fluorescência média (MFI) (FERNANDEZ-BECERRA *et al.*, 2010).

Para o ensaio com o soro/plasma de humanos foi utilizado o anticorpo IgG biotilado B1140 (MilliporeSigma, St. Louis, MO, USA) para detecção de anticorpos humanos naturais que reconheceram as proteínas recombinantes. O ensaio BioPlex foi padronizado para realização com soros de primatas não-humanos através da mesma metodologia, porém utilizando como anticorpo de detecção o anti-*monkey* IgG biotilado.

3.6. Análise Estatística

Os valores de corte (*cut-off*) para o Bioplex em cada placa foram determinados pela ligação de IgG a cada proteína recombinante. Para isso, soros de indivíduos negativos foram

usados em duplicata para obter os valores da intensidade de fluorescência média (MFI), após subtração da ligação do mesmo soro à GST isolada.

As amostras de soro/plasma foram analisadas em duplicatas, obtendo-se a MFI para cada amostra, desse valor foi subtraída a MFI do mesmo soro ligado à GST isolada. Os resultados obtidos foram expressos como resultados qualitativos e quantitativos: Os resultados qualitativos foram utilizados para realizar a somatória e comparação entre positivos e negativos das diferentes regiões estudadas. Os resultados quantitativos, foram obtidos através da normalização dos dados utilizando o Índice de Reatividade (IR). O IR foi estabelecido utilizando os valores de fluorescência expressos como MFI para cada amostra e divididos pelo *cut-off* de cada placa. Amostras com $IR \geq 1$ foram consideradas positivas.

Foi utilizada a média geométrica para o cálculo dos resultados e analisados por ANOVA, qui-quadrado e teste exato de Fisher. Estes testes foram realizados em colaboração com da Dra. Márcia Holcman, Estatística da SUCEN e

3.7. Aspectos éticos

A utilização das amostras neste estudo foi autorizada pelos responsáveis por sua guarda. As amostras humanas utilizadas são provenientes de projetos de pesquisa aprovados e estão armazenadas em Biorrepositório no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Of. CEPESH 020/2015), assim, obtendo a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH 1.003.485 de 15/04/2015). A Comissão de Pesquisa e Ética (CEP-IMT) e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), ambas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, após análise emitiram os Pareceres de Aprovação 2014/281A, autorizando a execução deste projeto. A coleta e utilização das amostras de primatas não-humanos da FPZSP possuem aprovação do IBAMA/SISBio (44.751).

4. RESULTADOS

4.1. Produção das proteínas recombinantes: Clonagem, expressão e purificação

Os fragmentos de diferentes regiões do gene MSP1 de *P. malariae* foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico do isolado I11. Os fragmentos purificados foram clonados em vetor pGEM-T Easy, sequenciados e posteriormente clonados em vetor de expressão pGEX-3Y em sítio de EcoRI. As sequências foram depositadas em GenBank (F1, #KR072279; F2, #KY189271; F3, #KY189272; F4, #KY189273; PmMSP119, #KY189274). Os tamanhos dos fragmentos obtidos e respectivas porcentagens de identidade com as proteínas PvMSP1 e PfMSP1 são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Características dos fragmentos utilizados neste estudo.

Fragmento	Tamanho (pb)	Número de aminoácidos	% de identidade com PvMSP1	% de identidade com PfMSP1
F1	532	177	38	47
F2	618	206	34	28
F3	679	226	49	59
F4	442	147	54	59
PmMSP1 ₁₉	267	89	57	45

Com os clones em pGEX-3Y foram estabelecidas as condições de expressão ótimas, definidas por crescimento celular em meio de Luria-Bertani, e indução a 37°C com IPTG 0,3 mM durante 3 h. Este protocolo resultou na expressão de nível elevado das proteínas recombinantes F1, F2, F3, PmMSP119, mas não para F4. As proteínas recombinantes foram obtidas na fração solúvel, fusionadas a glutathione S-transferase (GST) em sua extremidade N-terminal, mostrando massas moleculares aproximadas de 49 kDa para o F1, 62 kDa para o F2 (maior do que o esperado, 49 kDa), 60 kDa para o F3, 48 kDa para o F4 e 38 kDa para o PmMSP119 no SDS-PAGE 12%, como mostra a Figura 5A. O vetor sem inserto foi utilizado para produzir a proteína GST, que migrou com uma massa de 26 kDa. Bandas menores, produtos de degradação e proteínas truncadas também foram observadas, sobretudo na purificação da proteína F4.

4.2. Avaliação das proteínas recombinantes purificadas por ensaio de Western blot

A identidade e a especificidade das proteínas recombinantes foram analisadas por Western blot utilizando um *pool* de soros policlonais de pacientes positivos para *P. malariae* confirmados por PCR e mostraram um padrão de migração específica e semelhante ao do SDS-PAGE. As proteínas recombinantes de interesse F1, F2, F3, F4 e PmMSP₁₉ reagiram com as amostras de soros humanos de pacientes com malária causada por *P. malariae*. Amostras de soro de indivíduos saudáveis foram usadas como controle negativo e não mostraram reatividade. GST não foi reconhecida pelos soros de pacientes com malária devido a *P. malariae*, nem pelos soros de indivíduos saudáveis (Figura 5B). A reatividade das proteínas MSP₁₉ de *P. malariae* (PmMSP₁₉), *P. vivax* (PvMSP₁₉) e *P. falciparum* (PfMSP₁₉) recombinantes foi avaliada por ELISA com cinco soros de pacientes e demonstrou reconhecimento específico para cada espécie de plasmódio (ELIZARDEZ *et al.*, 2019).

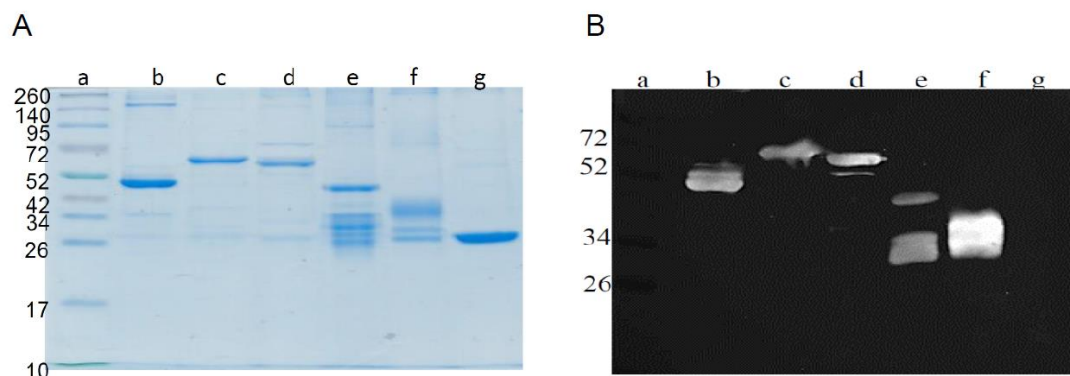


Figura 5. (A) As proteínas recombinantes foram submetidas a eletroforese de SDS-PAGE a 12% e coradas com Azul de Coomassie. a: Padrão de peso molecular (kDa), a: Padrão de peso molecular (Thermo /Fermentas, pesos em kDa), b: F1, c: F2, d: F3, e: F4, f: PmMSP119 e g: GST. (B) Western blot mostrando o reconhecimento de proteínas por um pool de soros de pacientes com *P. malariae*. b: F1, c: F2, d: F3, e: F4, f: PmMSP119 e g: GST.

4.3. Padronização dos Ensaio Multiplex com Proteínas recombinantes

Para o ensaio multiplex, as *beads* magnéticas carboxiladas BioPlex (BioRad) foram covalentemente revestidas com as nossas diferentes proteínas recombinantes através do uso do kit de acoplamento BioPlex *amine coupling* (Bio-Rad). Uma descrição dos ensaios de padronização é apresentada a seguir:

Inicialmente foi realizado um acoplamento teste para validação em que as *beads* magnéticas carboxiladas BioPlex (BioRad) foram covalentemente revestidas com as nossas diferentes proteínas recombinantes através do uso do kit de acoplamento Bio-plex *Amine Coupling* (Bio-Rad), conforme Procedimento Operacional Padrão estabelecido pela Dra. Maria del Carmen Fernandez Becerra (Assistant Research Professor) do Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal), e Germans Trias i Pujol Health Science Research Institute (IGTP), ambos na Espanha. Para a validação do acoplamento foram utilizados 2000 *beads* de cada proteína por amostra em um SinglePlex na ausência de soro teste, somente com o anti-GST biotilado. A leitura foi realizada no equipamento BioPlex 200 BioRad em modo High. Os resultados das fluorescências de cada *bead* foram considerados satisfatórios, o que nos permitiu prosseguir com os experimentos.

4.4. Resultados do multiplex das amostras de primatas não-humanos (PNHs)

4.4.1. Padronização dos ensaios e obtenção dos controles para PNHs

A padronização do teste para as amostras de primatas iniciou com a seleção das amostras de soro/plasma de primatas como potenciais controles positivos e negativos com base em resultados sorológicos de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) realizado com peptídeos de CSP (*circumsporozoite protein*) para *P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum* (BUENO, Marina G. *et al.*, 2013; DUARTE, Ana Maria R. de C. *et al.*, 2006). Essas amostras foram testadas previamente por Bioplex e foram selecionadas as amostras positivas com as mais altas fluorescências possíveis para cada espécie de *Plasmodium* isoladamente.

As amostras de soro/plasma de primatas não-humanos (PNH) foram distribuídas em duplicata na placa teste em proporções similares (conforme disponibilidade) de acordo com a origem da amostra (Região Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado), a fim de eliminar o viés da localidade. Cada placa teste continha as duplicatas, juntamente com os controles positivos e negativos, e o controle de qualidade do acoplamento, para avaliar a leitura da fluorescência em cada placa e verificar o comportamento da leitura de cada proteína (Figura 6).

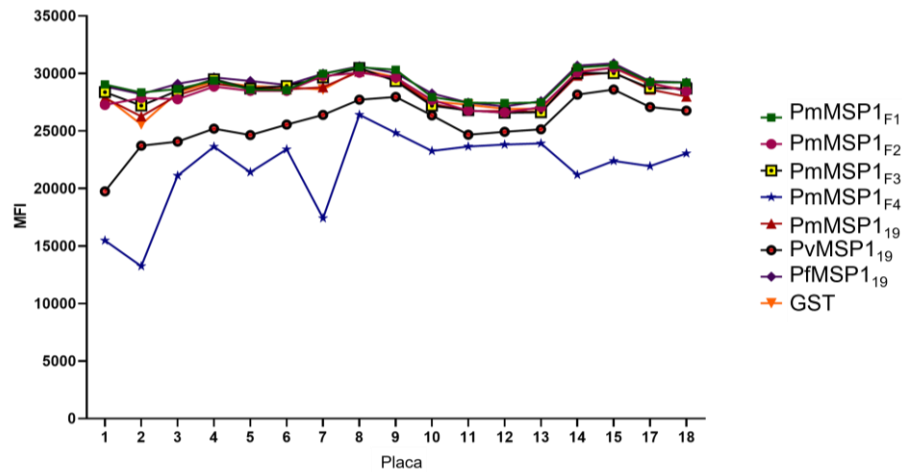


Figura 6. Análise da eficiência do acoplamento utilizando anticorpo IgG anti-GST nas amostras de PNH.

4.4.2. Avaliação da resposta imune contra MSP1 de PNHs

Foram analisadas 495 amostras de soro de PNHs, pertencentes aos dois grupos: (i) animais de vida livre ($n = 373$); (ii) animais cativos ($n = 122$). Do total de amostras analisadas, 199 (40,2%) apresentaram anticorpos IgG contra a pelo menos, uma das proteínas recombinantes da malária. O fragmento referente à N-terminal de *P. malariae* (PmMSP1_{F1}) teve maior frequência no reconhecimento, com um total de 109 (22%), seguidos dos soros que reconheceram a C-terminal de *P. vivax* PvMSP1₁₉ (19,8%). Os soros menos reativos foram para a C-terminal de *P. falciparum* PfMSP1₁₉ (1,6%) (Tabelas 3, 4 e 5).

Tabela 3. Porcentagem de soros reativos (animais de vida livre e cativos, $n = 495$) para as proteínas recombinantes MSP1.

Proteínas Recombinantes	Positivos	(%)
PmMSP1 _{F1}	109	(22,0)
PmMSP1 _{F2}	91	(18,4)
PmMSP1 _{F3}	93	(18,8)
PmMSP1 _{F4}	16	(3,2)
PmMSP1 ₁₉	86	(17,4)
PvMSP1 ₁₉	98	(19,8)
PfMSP1 ₁₉	8	(1,6)

Tabela 4. Frequências absolutas e relativas de primatas não humanos de Vida Livre positivos por ensaio Bioplex por proteína MSP1

Famílias	Espécies	Proteínas Recombinantes						
		PmMSP1 _{F1}	PmMSP1 _{F2}	PmMSP1 _{F3}	PmMSP1 _{F4}	PmMSP1 ₁₉	PvMSP1 ₁₉	PfMSP1 ₁₉
Aotidae	<i>Aotus azarae</i>	- (0/10)	- (0/10)	10,0 (1/10)	- (0/10)	10,0 (1/10)	- (0/10)	- (0/10)
	<i>Aotus</i> sp.	- (0/4)	- (0/4)	- (0/4)	- (0/4)	- (0/4)	- (0/4)	- (0/4)
Atelidae	<i>Alouatta belzebul</i>	100,0 (1/1)	- (0/1)	100,0 (1/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)
	<i>Alouatta caraya</i>	1,2 (1/86)	2,3 (2/86)	1,2 (1/86)	- (0/86)	1,2 (1/86)	1,2 (1/86)	1,2 (1/86)
	<i>Alouatta guariba</i>	29,8 (17/57)	36,8 (21/57)	28,1 (16/57)	3,5 (2/57)	33,3 (19/57)	73,7 (42/57)	1,8 (1/57)
	<i>Alouatta puruensis</i>	35,7 (5/14)	42,9 (6/14)	28,6 (4/14)	- (0/14)	28,6 (4/14)	7,1 (1/14)	- (0/14)
	<i>Alouatta</i> sp.	22,6 (12/53)	11,3 (6/53)	22,6 (12/53)	1,9 (1/53)	22,6 (12/53)	47,2 (25/53)	- (0/53)
	<i>Ateles chamek</i>	73,3 (11/15)	53,3 (8/15)	46,7 (7/15)	6,7 (1/15)	53,3 (8/15)	6,7 (1/15)	- (0/15)
	<i>Lagothrix cana</i>	69,2 (9/13)	69,2 (9/13)	69,2 (9/13)	15,4 (2/13)	69,2 (9/13)	7,7 (1/13)	7,7 (1/13)
Callitrichidae	<i>Callithrix penicillata</i>	- (0/21)	4,8 (1/21)	38,1 (8/21)	- (0/21)	- (0/21)	- (0/21)	- (0/21)
	<i>Cebuella pygmaea niveiventris</i>	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)
	<i>Leontocebus labiatus</i>	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)
	<i>Leontocebus weddelli</i>	- (0/5)	- (0/5)	- (0/5)	- (0/5)	- (0/5)	- (0/5)	- (0/5)
	<i>Mico melanurus</i>	50,0 (1/2)	50,0 (1/2)	50,0 (1/2)	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)
Cebidae	<i>Cebus albifrons</i>	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	100,0 (1/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)
	<i>Cebus</i> sp.	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)
	<i>Saimiri boliviensis</i>	50,0 (1/2)	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)
	<i>Saimiri</i> sp.	100,0 (1/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)
	<i>Saimiri ustus</i>	41,7 (5/12)	41,7 (5/12)	41,7 (5/12)	16,7 (2/12)	25,0 (3/12)	8,3 (1/12)	8,3 (1/12)
	<i>Sapajus apella</i>	57,9 (11/19)	36,8 (7/19)	26,3 (5/19)	21,1 (4/19)	36,8 (7/19)	10,5 (2/19)	5,3 (1/19)
	<i>Sapajus cay</i>	- (0/1)	100,0 (1/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)	- (0/1)
	<i>Sapajus macrocephalus</i>	33,3 (1/3)	33,3 (1/3)	33,3 (1/3)	33,3 (1/3)	33,3 (1/3)	- (0/3)	- (0/3)
	<i>Chiropotes albinasus</i>	50,0 (1/2)	50,0 (1/2)	50,0 (1/2)	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)	- (0/2)
	<i>Pithecia mittermeieri</i>	40,0 (10/25)	16,0 (4/25)	24,0 (6/25)	- (0/25)	36,0 (9/25)	- (0/25)	4,0 (1/25)
	<i>Plecturocebus brunneus</i>	21,4 (3/14)	14,3 (2/14)	14,3 (2/14)	- (0/14)	21,4 (3/14)	- (0/14)	- (0/14)
<i>Plecturocebus dubius</i>	66,7 (2/3)	33,3 (1/3)	33,3 (1/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/3)	
<i>Plecturocebus</i> sp.	33,3 (2/6)	16,7 (1/6)	- (0/6)	- (0/6)	16,7 (1/6)	16,7 (1/6)	- (0/6)	

A porcentagem de soros de animais de vida livre reagindo às proteínas recombinantes foi significativamente maior (Teste qui-quadrado, $p < 0,0001$) nos animais da Mata Atlântica (63,1%), em comparação aos da Amazônia e Cerrado, que foram 49% e 11,2% respectivamente (Figura 7).

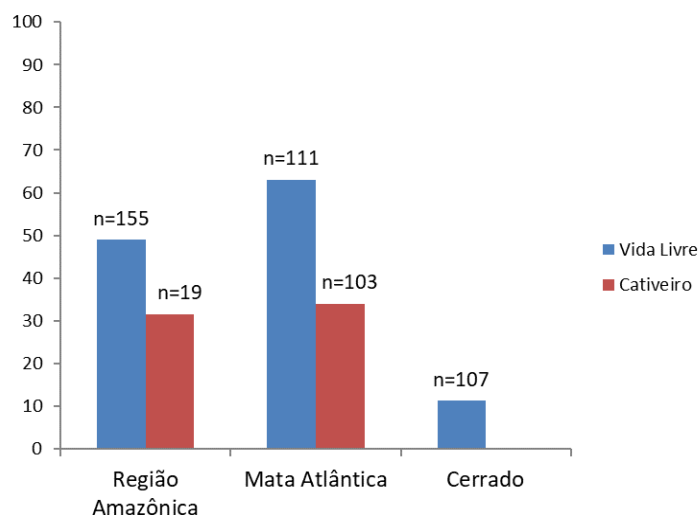


Figura 7. Porcentagem de soros positivos de primatas não humanos de vida livre (azul) e de cativos (vermelhos) para uma ou mais das proteínas recombinantes MSP1.

As proteínas com as maiores taxas de reconhecimento aos soros de animais de vida livre da Região Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado foram PmMSP1_{F1}, PvMSP1₁₉ e PmMSP1_{F3}, respectivamente (Figura 8A).

Quanto aos soros de animais em cativeiro, a porcentagem de amostras de soros reativos a algum dos antígenos recombinantes testados foi semelhante (teste exato de Fisher, $p > 0,999$) para os da Mata Atlântica (35%) e da Amazônia (31,6%). As maiores taxas de soros reativos desses animais da região amazônica foram para as proteínas PmMSP1_{F1} e PmMSP1_{F2}, enquanto os animais da Mata Atlântica foram mais reativos para PvMSP1₁₉ (Figura 8B). Dois soros de animais em cativeiro classificados aqui como Mata Atlântica foram positivos para PfMSP1₁₉ (Figura 8B). No entanto, esses soros eram de animais trazidos da região amazônica e mantidos no Zoológico de São Paulo.

Na Amazônia não houve diferença entre a reatividade dos animais de cativeiro (31,6%) e vida livre (49,0%) (teste exato de Fisher, $p = 0,2230$). Por outro lado, na Mata Atlântica, os animais de vida livre apresentaram reatividade maior (63,1%) que os de cativeiro (35%) (teste exato de Fisher, $p < 0,0001$).

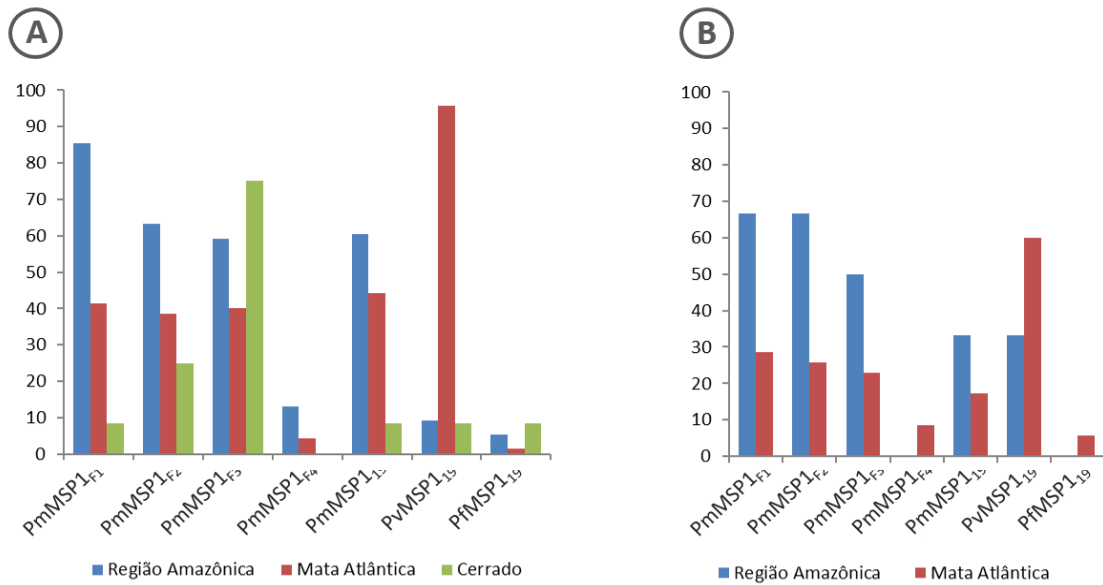


Figura 8. Porcentagem de soros positivos de primatas não-humanos de vida livre (A) e cativos (B) das regiões Amazônica (azul), Mata Atlântica (vermelha) e Cerrado (verde) para cada uma das proteínas recombinantes MSP1.

Das 164 amostras positivas para qualquer uma das proteínas recombinantes de *P. malariae*, 34 (20%) reagiram concomitantemente a quatro proteínas (PmMSP1_{F1}, PmMSP1_{F2}, PmMSP1_{F3} e PmMSP1₁₉), enquanto 61 (37%) soros reagiram a apenas uma das proteínas, com a menor positividade para PmMSP1_{F4} (Figura 9).

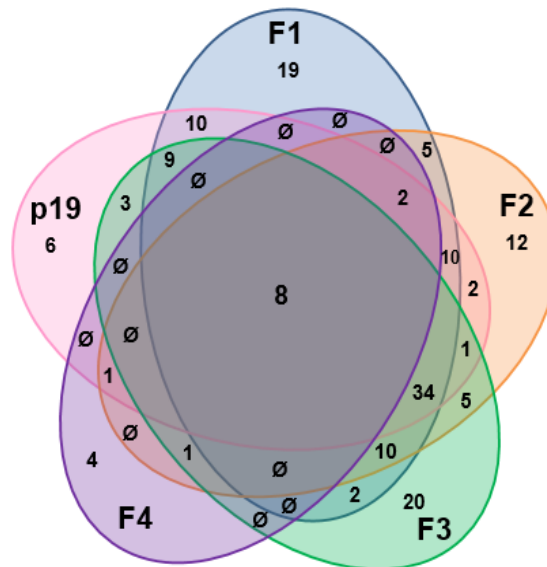


Figura 9. Diagrama de Venn das amostras positivas contra antígenos de *Plasmodium malariae*.

4.4.3. Histórico da exposição de PNHs à malária

Um total de 148 soros (29,9%) foram considerados positivos para a região C-terminal de MSP1 dos diferentes parasitas da malária (PmMSP1₁₉, PvMSP1₁₉ e PfMSP1₁₉). Destes, 43 (29,1%) foram positivos para mais de uma espécie de *Plasmodium*: *P. falciparum* e *P. malariae* (2,7%); *P. vivax* e *P. malariae* (25,7%); e *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* (0,7%) (Figura 10A). Estes dados, juntamente com os altos IRs para *P. malariae* e *P. vivax* (Figura 10B) evidenciam a exposição ao longo da vida dos animais a essas espécies de *Plasmodium*.

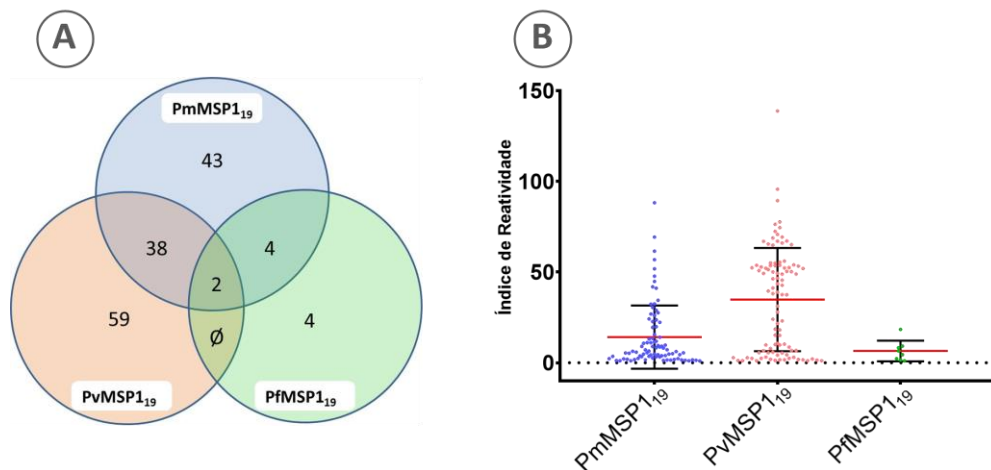


Figura 10. Soros reativos à região C-terminal de MSP1 das três espécies de *Plasmodium*, PmMSP1₁₉, PvMSP1₁₉ e PfMSP1₁₉. A) Diagrama de Venn de soros positivos para a MSP1 das três espécies de *Plasmodium*; B) Índice de Reatividade dos soros positivos para C-terminal. A linha vermelha representa o IR médio obtido para cada proteína recombinante e as barras de erro (pretas) representam o desvio padrão.

A Figura 11 mostra a frequência de animais de vida livre com soros positivos, classificados por gênero e região. Dos 13 gêneros de animais da região amazônica, 11 apresentaram soros positivos (Figura 11A), enquanto na Mata Atlântica, apenas espécimes do gênero *Alouatta* apresentaram tal positividade (Figura 11B). Curiosamente, na região do Cerrado, soros de animais de outro gênero (*Callithrix*) foram considerados positivos, além dos do gênero *Alouatta* (Figura 11C).

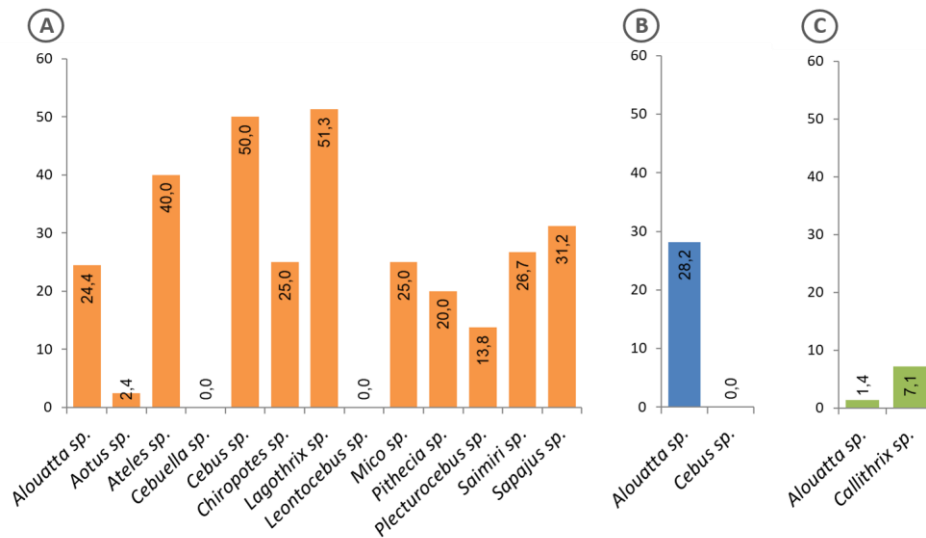


Figura 11. Frequência de animais de vida livre classificados em nível de gênero, com soros reativos à MSP1 recombinante de *Plasmodium*. (A) Animais da região amazônica, (B) Mata Atlântica e (C) Cerrado. As percentagens calculadas de soros positivos são mostradas dentro das barras.

Evidências de exposição a parasitas da malária por animais mantidos em cativeiro em nível de gênero são mostradas na Figura 12. Enquanto os animais do gênero *Lagothrix* da região amazônica apresentaram a maior taxa de positividade (Figura 12A), os da Mata Atlântica eram do gênero *Brachyteles* (Figura 12B).

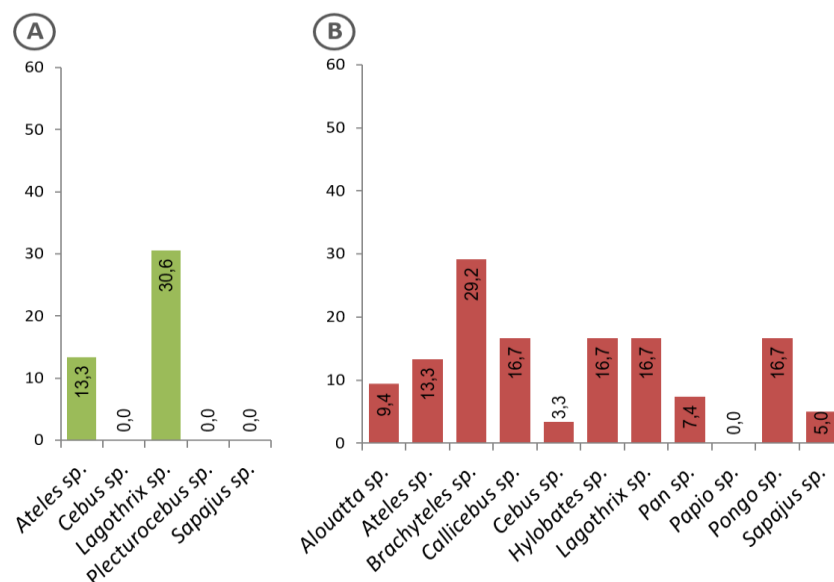


Figura 12. Frequência de animais em cativeiro com soros positivos para a MSP1 recombinante de *Plasmodium*, classificados em nível de gênero. (A) Animais da região amazônica, (B) Mata Atlântica.

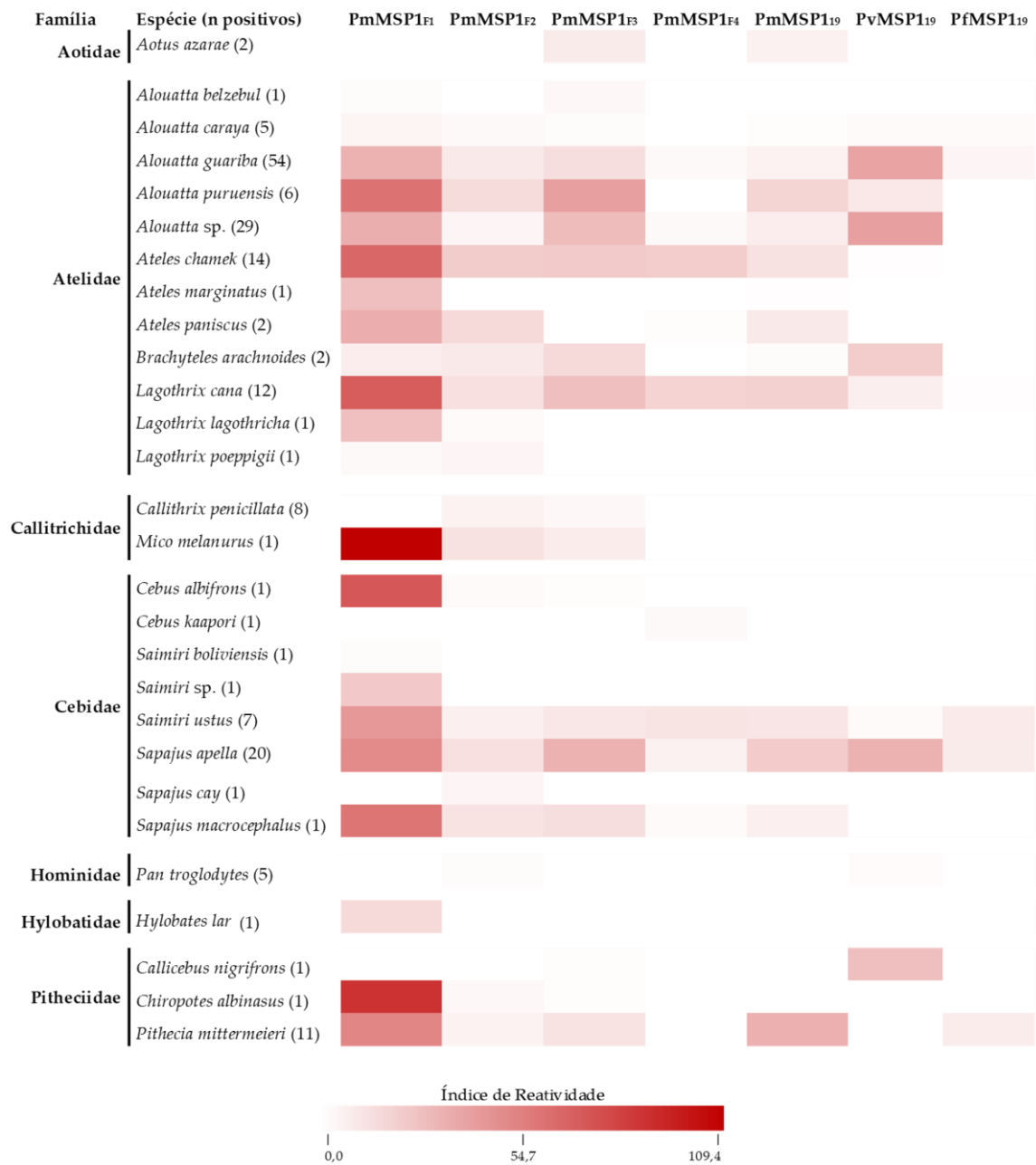


Figura 13. Mapa de calor da soroprevalência expressa como índice de reatividade (IR) das diferentes espécies de PNHs reconhecendo as proteínas recombinantes das três espécies de *Plasmodium*.

A análise da prevalência de IgG entre as diferentes espécies de primatas contra as nossas sete proteínas recombinantes revelou que a região N-terminal da MSP1 de *P. malariae* (PmMSP1_{F1}) apresentou IR superior a todas as demais proteínas, com níveis de anticorpos significativamente superiores às demais proteínas de *P. malariae* (PmMSP1_{F2}, PmMSP1_{F3},

PmMSP1_{F4}, PmMSP1₁₉) (<0,0001, ANOVA), bem como para a C-terminal de *P. vivax* (PvMSP1₁₉) (<0,0037, ANOVA) e de *P. falciparum* (PfMSP1₁₉) (<0,0003, ANOVA), conforme ilustrado na figura 13.

Os mais altos IRs para PmMSP1_{F1} foram apresentados por um espécime de *Mico melanurus* (IR=109,4), da família Callitrichidae, e um espécime de *Chiropotes albinus*, ambos pertencentes ao nosso grupo de amostras de animais de vida livre da região amazônica, coletados em remanescente de floresta próximo à Usina Hidrelétrica de Rondon II (UHE-Rondon II), no município de Pimenta Bueno, no estado de Rondônia.

4.5. Resultados do multiplex das amostras de humanos

4.5.1. Análise da eficiência de acoplamento de proteínas de fusão GST a *beads* magnéticas carboxiladas BioPlex

O acoplamento das proteínas recombinantes foi ajustado para melhor eficiência de acordo com o perfil de cada proteína e sua eficiência foi avaliada e determinada pela análise feita primeiro em Singleplex, e posteriormente avaliada no Multiplex (Figura 14A). As amostras de soro/plasma de humanos foram analisadas em duplicata e durante as análises foram distribuídas nas placas-teste em proporções similares (conforme disponibilidade) de acordo com a origem da amostra (Região Amazônica, Mata Atlântica), para eliminar o viés da localidade.

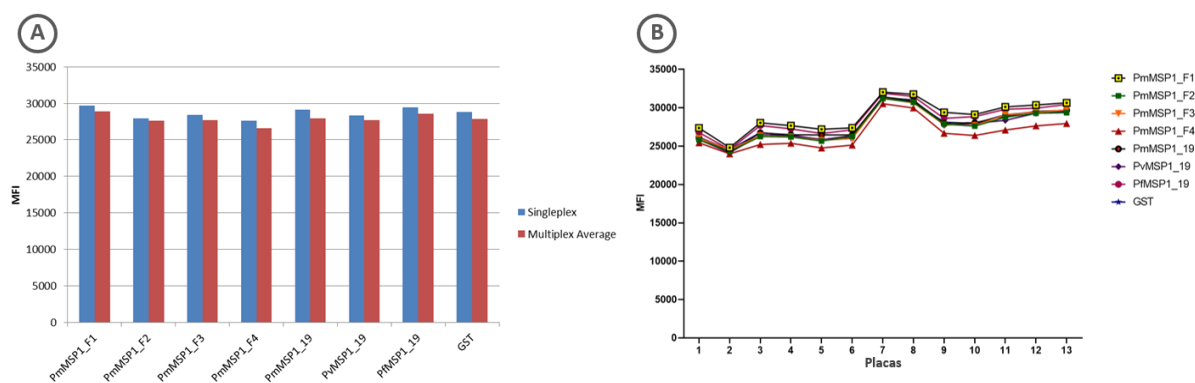


Figura 14. Análise da eficiência do acoplamento das proteínas recombinantes nas amostras de humanos utilizando anti-GST biotilado. A) Comparação entre Singleplex e Multiplex somente dos controles de qualidade. B) MFI dos controles de qualidade do acoplamento.

O controle de qualidade do acoplamento foi realizado em todas as placas de amostras testadas, utilizando anti-GST biotilado como anticorpo de detecção e na ausência de anticorpos naturais para esta avaliação, apresentando MFI, com variação mínima e muito semelhante para todas as proteínas (Figura 14B).

4.5.2. Determinação do *Cut-off*

Para determinar os valores de corte (*cut-off*) para cada proteína recombinante, em cada placa, soros de indivíduos negativos foram usados em duplicata para obter os valores de MFI. Os valores de corte são apresentados como a média geométrica dos valores obtidos com um painel de oito soros de controle negativo mais 3 desvios padrão e os valores de corte médios são mostrados na Figura 15. Para todas as proteínas recombinantes os *cut-offs* ficaram em torno de 200 MFI, exceto para PvMSP1₁₉ (~380 MFI).

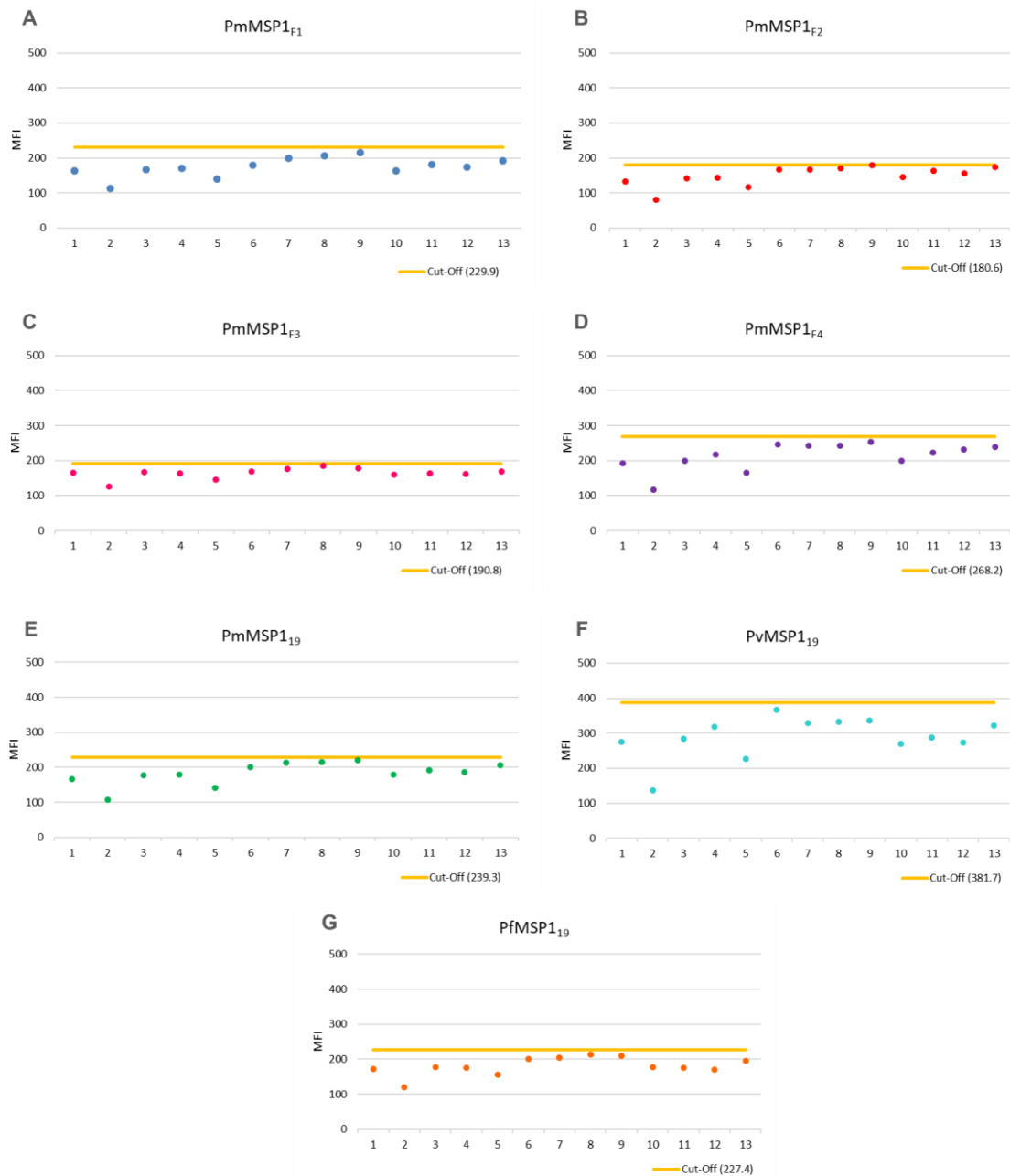


Figura 15. Distribuição dos valores de MFI obtidos para as proteínas recombinantes de MSP1 de *P. malariae* (A-E), *P. vivax* (F) e *P. falciparum* (G). Os pontos representam o valor médio (média aritmética) de MFI das duplicatas dos controles negativos presentes em cada placa de ensaio. A linha horizontal (amarela) representa a média geométrica da MFI dos controles negativos acrescido de três desvios padrão (*cut-off*) de cada proteína recombinante.

4.5.3. Resposta de anticorpos naturalmente adquiridos

Foram analisadas 416 amostras de soro / plasma de indivíduos residentes em duas regiões brasileiras endêmicas para malária: a região amazônica, nas localidades de Ramal do Granada, no Estado do Acre (= 238) e em Porto Velho, no Estado de Rondônia (= 52); e Mata Atlântica, no Parque Estadual Intervales em Guapiara, no Estado de São Paulo (= 126). Em uma análise geral, 289 (69,5%) amostras apresentaram anticorpos IgG contra a pelo menos uma das proteínas recombinantes. Os soros reativos ao *P. vivax* PvMSP1₁₉ foram os mais frequentes, com um total de 52,8%, seguidos dos reativos ao *P. falciparum* PfMSP1₁₉ com 21,5% de reconhecimento. Os soros foram menos reativos para os cinco fragmentos de *P. malariae* (Figura 16A).

O Índice de Reatividade (IR) para a porção C-terminal da proteína recombinante de *P. falciparum* (PfMSP1₁₉) foi significativamente mais alto em comparação com as outras proteínas recombinantes ($p < 0,0001$, ANOVA), seguido pelo C-terminal de *P. vivax* (PvMSP1₁₉) e o N-terminal de *P. malariae* (PmMSP1_{F1}), sendo este último o mais reativo entre as outras proteínas recombinantes de *P. malariae* (Figura 16B).

Indivíduos soropositivos para *P. vivax* apresentaram alto IR nas três localidades. Na região da Mata Atlântica (PE Intervales) as proteínas recombinantes PmMSP1_{F1} e PmMSP1_{F3} de *P. malariae* se destacaram com alto IR (41,7 e 37,2 respectivamente), e curiosamente foram encontradas três amostras que reconheceram PfMSP1₁₉ com IR próximo a 1,0 (Figura 16C). Em Ramal do Granada / AC, o IR foi baixo para *P. malariae* e altas taxas para *P. falciparum* (Figura 16D); e em Porto Velho / RO, *P. malariae* apresentou os menores índices e *P. falciparum* teve o maior IR (Figura 16E), com diferença significativa em relação ao Ramal do Granada / AC ($p < 0,0001$), embora ambas as localidades pertençam à Região Amazônica.

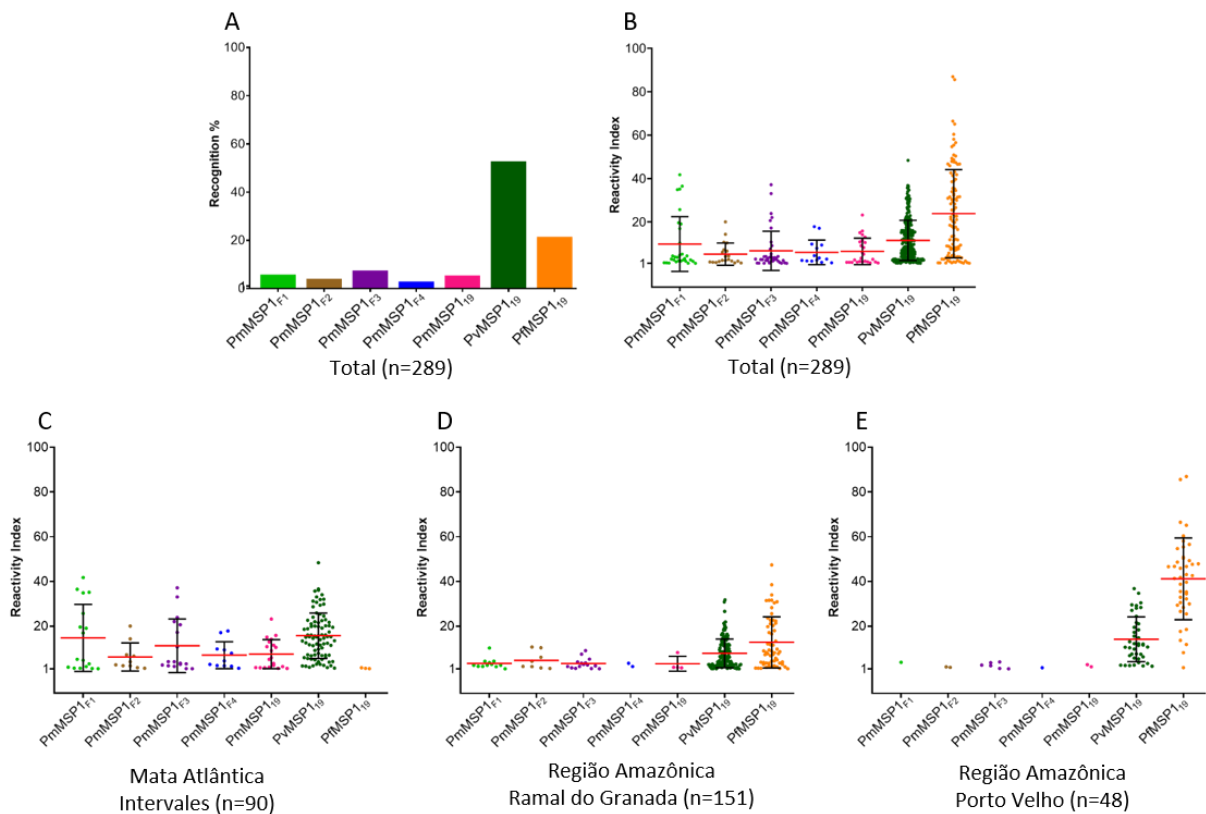


Figura 16. Comparação dos valores individuais do Índice de Reatividade (IR) de anticorpos IgG em soros de indivíduos de P.E. Intervalles / SP, Ramal do Granada / AC e Porto Velho / RO. A) Porcentagem de soros reativos às proteínas MSP1 recombinantes em todo o conjunto de amostras (total); B) Comparação do conjunto de amostras (total) utilizando os valores individuais do Índice de Reatividade (IR) de anticorpos IgG contra diferentes proteínas MSP-1 recombinantes em soros de indivíduos expostos à malária; C-E) As amostras de soro foram testadas em duplicata no Multiplex a uma diluição de 1:100 contra proteínas recombinantes. A linha vermelha representa o IR médio obtido para cada proteína recombinante.

Os dados detalhados mostram frequência na positividade para *P. vivax* PvMSP1₁₉ nas três localidades estudadas. *P. falciparum* foi frequente na região amazônica, com 45% de positividade em Porto Velho / RO e 26% no Ramal do Granada / AC. Em P.E. Intervalles (Mata Atlântica) prevaleceu *P. vivax* (53%) e *P. malariae*, que somado corresponde a 44,8%.

Na comparação da soroprevalência entre as amostras da Região Amazônica e da Mata Atlântica com seu ambiente divergente de malária (Figura 2A), apenas os três anticorpos específicos de MSP1₁₉ (*P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*) foram avaliados, para prevenir o viés em relação ao *P. malariae*. Assim, a figura 17 mostra a prevalência dos anticorpos para a MSP1₁₉ das três espécies de *Plasmodium* (PmMSP1₁₉, PfMSP1₁₉ e PvMSP1₁₉) em amostras

de soro do Brasil de acordo com o reconhecimento das três proteínas recombinantes em cada localidade analisada (figura 17D).

Dados sobre reconhecimento isolado mostraram altas taxas de positividade para PvMSP1₁₉ no Ramal do Granada e Intervalles, enquanto o reconhecimento de PfMSP1₁₉ foi mais frequente do que PvMSP1₁₉ em Porto Velho (figura 17D). A prevalência de anticorpos contra mais de uma espécie de *Plasmodium* foi maior do que a prevalência de anticorpos de uma única espécie em Porto Velho (Figura 17D). A soroprevalência isolada de *P. malariae* foi rara, sendo encontrada apenas no Ramal do Granada (Figura 17D). A presença geral de anticorpos de múltiplas espécies exibiu uma diferença importante na distribuição das combinações dentro das duas regiões, mostrando *P. vivax* e *P. falciparum* na Região Amazônica (Figura 17B) e *P. vivax* e *P. malariae* na Mata Atlântica (Figura 17C).

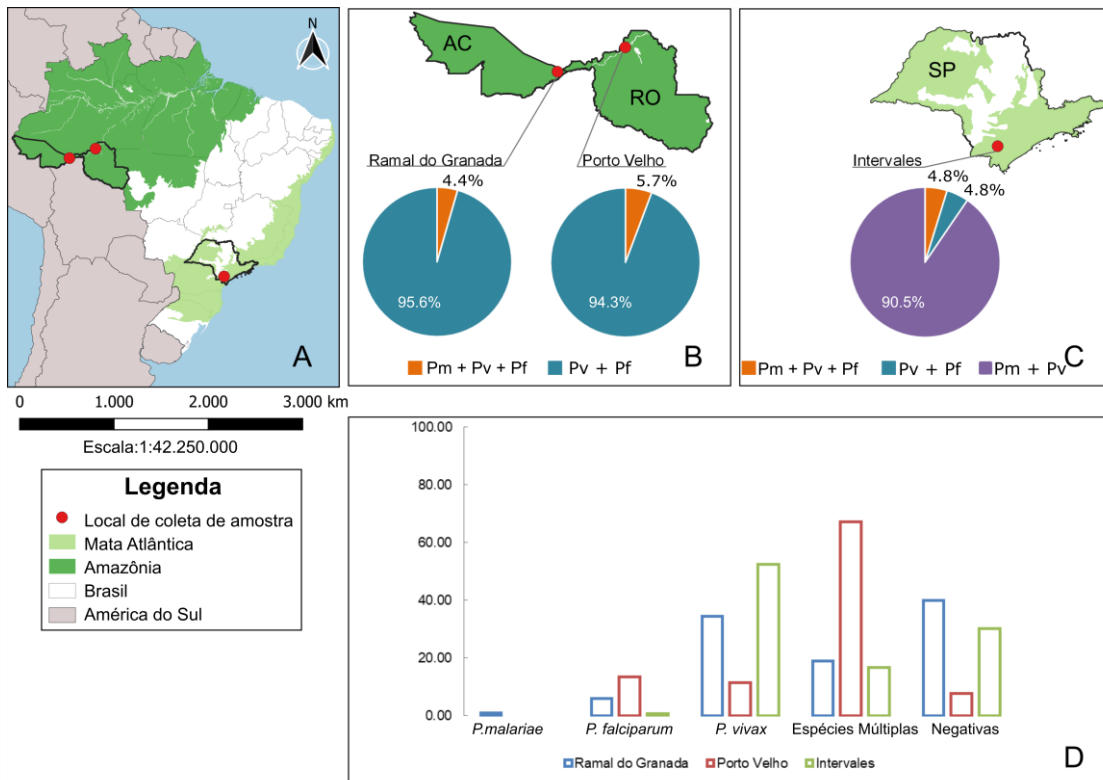


Figura 17. Respostas de anticorpos naturalmente adquiridos para antígenos PmMSP1₁₉, PvMSP1₁₉ e PfMSP1₁₉ recombinantes em três localidades (A). As porcentagens de soros positivos para múltiplas espécies de *Plasmodium* são mostradas para indivíduos da Região Amazônica (B) e da Mata Atlântica (C) para cada uma das proteínas recombinantes MSP1 reconhecidas em várias espécies, ou separadamente nas três localidades (D).

O reconhecimento das cinco proteínas de *P. malariae* criou dezoito padrões de combinação distintos, cuja frequência é mostrada na figura 18. É possível ver que o fragmento 3 (PmMSP1_{F3}) foi reconhecido separadamente com frequência de 27,9% e o fragmento 1 (PmMSP1_{F1}) teve 16,2% de frequência isoladamente. Os cinco fragmentos juntos foram reconhecidos em 8,8% das amostras, mostrando a média do IR em nosso conjunto de amostra. A combinação da porção N-terminal (PmMSP1_{F1}) com a porção C-terminal (PmMSP1₁₉) foi reconhecida em 1,5% das amostras, e nesta combinação ambas as proteínas apresentaram os maiores IRs (41,7 e 15,9 respectivamente) para *P. malariae*.

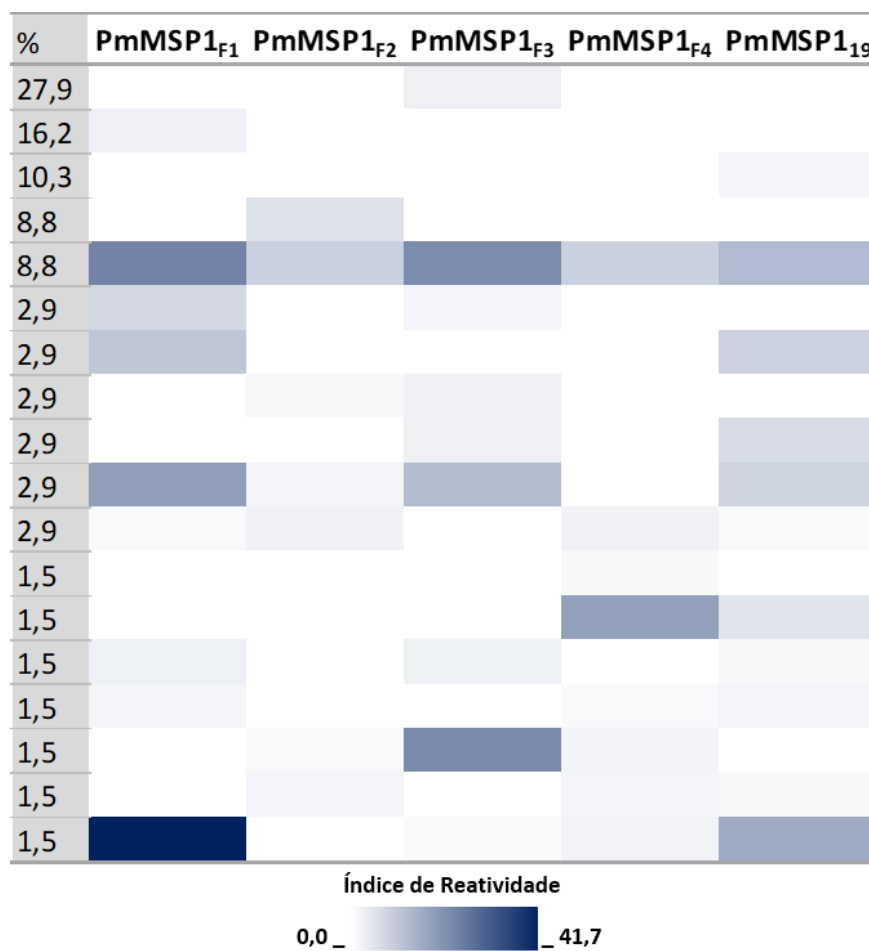


Figura 18. Mapa de calor exibindo o IR de cada proteína de *P. malariae* e os padrões de reconhecimento e combinações.

5. DISCUSSÃO

5.1. Discussão dos resultados obtidos para PNHs

5.1.1. Padronização dos ensaios Bioplex e teste de eficiência de acoplamento das proteínas recombinantes para PNH

O controle de qualidade do acoplamento foi realizado em cada placa. As *beads* covalentemente revestidas com as diferentes proteínas recombinantes foram testadas na mesma placa, com anti-GST biotilado, para avaliar a eficiência do acoplamento e verificar o comportamento de leitura de cada proteína. Observou-se que a leitura permaneceu estável e muito semelhante para todas as proteínas com variação mínima entre as placas, exceto para o fragmento 4 (PmMSP1_{F4}), que estava instável e menor em todas as leituras. PvMSP1₁₉ apresentou uma curva de fluorescência semelhante, mas ligeiramente inferior, exceto para a Placa 1. As diferenças de leitura entre as placas (viés) não interferiram nos resultados, pois foram eliminadas através da normalização dos dados, detalhado no tópico 4.7.

O fragmento 4 (PmMSP1_{F4}) se mostrou baixo em todas as leituras, cabendo lembrar que os resultados obtidos no SDS-PAGE e Western Blot para essa proteína, onde várias bandas foram observadas, demonstra provável presença de produtos de degradação e proteínas truncadas, que podem dificultar seu reconhecimento.

5.1.2. Imunidade humoral naturalmente adquirida contra parasitas da malária em PNHs

O Brasil abriga uma diversidade de espécies de primatas não humanos (PNHs) muito maior do que qualquer outro país; suas 110 espécies são responsáveis por cerca de 27%, ou um em cada quatro, NHPs no mundo. A região amazônica e a Mata Atlântica abrigam, cada uma, 20% desses táxons, incluindo algumas espécies ameaçadas de extinção (MITTERMEIER, 1988; MITTERMEIER *et al.*, 2007). Foi demonstrado que os PNHs estão infectados por parasitas do gênero *Plasmodium*, o agente etiológico da malária em humanos, criando riscos potenciais de transmissão zoonótica e consequentes problemas de saúde pública. Duas espécies de malária símia foram descritas no Brasil: *P. brasilianum*, um

parasita causador da malária quartã, genética e morfologicamente semelhante a *P. malariae*, descrito pela primeira vez em Uacari branco (*Cacajao calvus*) no alto Amazonas (norte do Brasil) (GONDER; VON BERENBERG-GOSSLER, 1908) e *P. simium*, um parasita causador da malária terçã, genética e morfologicamente semelhante ao *P. vivax*, descrito em um macaco bugio (*Alouatta fusca*) no Estado de São Paulo (Sul do Brasil) (FONSECA, 1951).

Recentemente, muitos estudos têm sido realizados para avaliar a presença de parasitas da malária em PNHs, tanto na Mata Atlântica quanto na Amazônia, com o objetivo de compreender seus papéis como reservatórios de malária (ALVARENGA *et al.*, 2015; 2017; ARAÚJO *et al.*, 2013; ASSIS *et al.*, 2016; BRASIL *et al.*, 2017; BUENO *et al.*, 2013; BUENO *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2015; GUIMARÃES *et al.*, 2015; GUIMARÃES *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2019). Alguns estudos sorológicos também foram realizados com o mesmo objetivo, mas sem o uso de qualquer antígeno do estágio eritrocítico do *P. malariae* (DUARTE *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2008; YAMASAKI *et al.*, 2011). No presente estudo, utilizamos cinco antígenos recombinantes derivados da proteína MSP1 dessa espécie de parasita. As proteínas recombinantes foram projetadas como proteínas de fusão com GST e usadas com sucesso com soros humanos em um estudo epidemiológico anterior (ELIZARDEZ *et al.*, 2019). Com essas cinco proteínas recombinantes de *P. malariae* MSP1 (PmMSP1_{F1}, PmMSP1_{F2}, PmMSP1_{F3}, PmMSP1_{F4}, PmMSP1₁₉), bem como com as de *P. falciparum* (PfMSP1₁₉) e *P. vivax* (PvMSP1₁₉), descobrimos que cerca de 40% dos soros de PNHs, de diferentes áreas do Brasil, foram reativos aos antígenos recombinantes, sendo PmMSP1_{F1} o mais detectado. Isso pode refletir a potencialmente alta imunogenicidade desta região de *P. malariae* MSP1, como a C-terminal da MSP1 de *P. vivax* e *P. falciparum*, conforme descrito em humanos (POLLEY *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 1997). A reatividade para a porção C-terminal de PmMSP1 (PmMSP1₁₉) também foi alta, como demonstrado em estudos que envolveram a mesma região das proteínas MSP1 de *P. vivax* e *P. falciparum* em humanos (PRIEST *et al.*, 2018). Também foram encontrados soros com anticorpos para outras regiões de *P. malariae* MSP1, com menor frequência para PmMSP1_{F4}, o que pode ser devido à sua baixa capacidade de ligação às *beads*, conforme observado no ensaio de eficiência de acoplamento.

As estimativas sorológicas se correlacionam bem com as medições parasitológicas e entomológicas na avaliação da intensidade da transmissão e dos riscos espaciais e demográficos para a malária (DRAKELEY *et al.*, 2005; STEWART *et al.*, 2009). O número

de soros positivos de animais da Mata Atlântica foi maior do que na região amazônica, mostrando uma provável maior circulação de *Plasmodium* entre os PNHs dessa área. Isso também pode refletir a proximidade dos PNHs com os humanos em uma densidade populacional mais alta na Mata Atlântica. O número de soros positivos para PNHs no Cerrado foi baixo, como esperado, devido ao baixo nível de incidência de malária no Brasil Central. Outro achado esperado era a maior prevalência de anticorpos anti-*P. vivax* e *P. malariae* no soro de NHPs da Mata Atlântica, pois foi demonstrado que *P. simium*, o equivalente a *P. vivax*, e *P. brasilianum*, o equivalente a *P. malariae*, são prevalentes nesta área, sendo o primeiro o mais prevalente (ALVARENGA *et al.*, 2015; BUERY *et al.*, 2017; COSTA, Daniela Camargos *et al.*, 2014).

É importante notar aqui a maior diversidade de PNHs da Região Amazônica portando anticorpos anti-MSP1, em comparação com a diversidade de PNHs da Mata Atlântica, onde apenas animais do gênero *Alouatta* foram encontrados com anticorpos. Esta singularidade foi observada desde a descrição do primeiro animal infectado com *Plasmodium* (ABREU *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2014; DEANE, 1992; DUARTE *et al.*, 2008; FONSECA, 1951). Esses resultados podem refletir os diferentes nichos ecológicos de cada componente do sistema da malária, os humanos, os PNHs, os mosquitos vetores e os parasitas. Mais pesquisas são necessárias para avaliar todas essas relações.

Os PNHs soropositivos indicam infecções prévias, bem como a potencial presença de animais infectados nas áreas pesquisadas, o que pode ter um papel na manutenção da malária humana, dificultando a eliminação ou mesmo o controle da doença. Além disso, o comércio ilegal de animais silvestres, a alocação de espécies para cativeiro ou o esforço para conservá-las (translocação ou reintrodução), favorece a movimentação de animais e pode favorecer a transmissão de doenças (GÓMEZ; AGUIRRE, 2008; KOCK; WOODFORD; ROSSITER, 2010). Assim, é necessária a realização de um teste rápido, barato e eficaz para o diagnóstico de *Plasmodium* nos PNHs, a fim de contribuir para a Vigilância Única. Demonstramos que as proteínas recombinantes MSP1 utilizadas neste estudo são candidatas úteis e importantes a serem incluídas em ferramentas de diagnóstico para a vigilância e, em última instância, para o controle ou eliminação da malária.

5.2. Discussão dos resultados obtidos para amostras de humanos

Estudos para a detecção de anticorpos contra proteínas MSP1 de *Plasmodium* são cada vez mais usados para mapear distribuições geográficas, soroprevalência e intensidades de transmissão da infecção por malária (PLUCINSKI *et al.*, 2018; ASSEFA *et al.*, 2019; STEINHARDT *et al.*, 2021). A porção C-terminal da proteína (MSP1₁₉) é uma candidata promissora para a vacina contra a malária, por ser imunogênica (COSTA *et al.*, 2020; PUNNATH *et al.*, 2021), sendo, portanto, extensivamente analisada como alvo imunológico em muitos estudos (ASSEFA *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2020; FELEKE *et al.*, 2019; MUERHOFF *et al.*, 2010; PUNNATH *et al.*, 2021). Por outro lado, estudos também usam a porção N-terminal da MSP1, que induz alta prevalência de anticorpos IgG em infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* (CASSIANO *et al.*, 2016; COWAN *et al.*, 2014; STORTI-MELO *et al.*, 2011; YUEN *et al.*, 2007). Embora já existam alguns estudos utilizando a MSP1 de *P. malariae* (PRIEST *et al.*, 2018; LABADIE-BRACHO; VAN GENDEREN; ADHIN, 2020), nenhum inquérito soropidemiológico foi realizado no Brasil, deixando lacunas quanto à ocorrência do parasita em diferentes cenários endêmicos para a malária no Brasil. Estudos anteriores realizados por nosso grupo já mostraram que proteínas PmMSP1 recombinantes podem ser marcadores diagnósticos úteis de *P. malariae* em estudos epidemiológicos (ELIZARDEZ *et al.*, 2019). Aqui, analisamos a prevalência de indivíduos em áreas endêmicas de malária no Brasil com anticorpos adquiridos naturalmente contra sete proteínas recombinantes, incluindo *P. malariae* (PmMSP1_{F1}, PmMSP1_{F2}, PmMSP1_{F3}, PmMSP1_{F4} e PmMSP1₁₉), *P. falciparum* (PfMSP1₁₉) e *P. vivax* (PvMSP1₁₉).

Anticorpos contra a PvMSP1₁₉ foram identificados em mais da metade de nosso conjunto de amostras, seguido por aqueles para PfMSP1₁₉, e em porcentagens menores por aqueles contra as diferentes proteínas recombinantes de *P. malariae* (PmMSP1_{F1}, PmMSP1_{F2}, PmMSP1_{F3}, PmMSP1_{F4} e PmMSP1₁₉), corroborando com dados históricos brasileiros de malária que têm demonstrado a predominância de *P. vivax* sobre *P. falciparum* ao longo dos anos (CARLOS *et al.*, 2019; SILVA-NUNES *et al.*, 2006). Porém, comparando o reconhecimento das proteínas recombinantes pelo IR obtido para cada proteína, níveis muito semelhantes foram obtidos para PvMSP1₁₉ e *P. malariae*, principalmente para PmMSP1_{F1} e PmMSP1_{F3} na região da Mata Atlântica, área documentada para presença de infecções causadas por *P. malariae* (BUERY *et al.*, 2021).

O maior índice de reatividade para anticorpos IgG entre as três espécies foi encontrado para *P. falciparum* principalmente em Porto Velho, um conhecido *hotspot* para esta espécie no Brasil (CARLOS *et al.*, 2019). A porção C-terminal da proteína MSP1 de *P. falciparum* (PfMSP1₁₉), já se mostrou relacionada à aquisição de imunidade clínica, provavelmente cumulativa, com expansão e refinamento de um repertório de anticorpos, protegendo o indivíduo de malária grave, que é rara na Região Amazônica (MEDEIROS *et al.*, 2013).

Na Mata Atlântica, embora seja registrado apenas um pequeno número de casos clínicos de malária, grande parte da população apresenta evidências sorológicas de exposição recente a *P. vivax* ou *P. malariae* (CURADO *et al.*, 1997, 2006), sugerindo uma alta prevalência de infecções assintomáticas, que podem atuar como reservatórios da infecção, sustentando a transmissão e minando as estratégias de erradicação e controle da malária (BOUSEMA *et al.*, 2014; CHEAVEAU *et al.*, 2019; NOGUEIRA *et al.*, 2006). Em nosso estudo, indivíduos residentes na área da Mata Atlântica apresentaram altas taxas de reatividade de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes de *P. malariae* (PmMSP1_{F1}, PmMSP1_{F2}, PmMSP1_{F3}, PmMSP1_{F4} e PmMSP1₁₉) em comparação com outras localidades, refletindo um perfil de transmissão cumulativa. Isso sugere que esses indivíduos podem ser frequentemente expostos a infecções causadas por esta espécie ou mesmo manter essas infecções por longos períodos, uma vez que infecções por *P. vivax* induzem respostas de células B de memória de longa duração, mesmo em ambientes com transmissão muito baixa (WIPASA *et al.*, 2010).

Curiosamente, três amostras da Mata Atlântica reconheceram a porção C-terminal de *P. falciparum* (PfMSP1₁₉) com IR muito baixo, em concordância com relatórios anteriores (CURADO *et al.*, 2006; MULTINI *et al.*, 2019). A infecção por *P. falciparum* na Mata Atlântica foi previamente detectada por PCR em indivíduos de Interales, que não apresentavam sintomas clássicos e relataram não ter viajado para áreas endêmicas de malária, como a região da Amazônia (CURADO *et al.*, 2006). Evidências recentes apontam para a presença de *P. falciparum* em um ciclo silencioso, detectado apenas por métodos moleculares em indivíduos assintomáticos (rev. em BUERY *et al.*, 2021).

A soroprevalência geral de PvMSP1₁₉ altamente imunogênica na Amazônia brasileira estava de acordo com outros relatos desta área endêmica, onde quase 70% da população estudada era portadora de anticorpos para PvMSP1₁₉ (PIRES *et al.*, 2018). Da mesma forma, *P. falciparum* também apresentou alto IR de anticorpos IgG na Região Amazônica, mostrando

um perfil de exposição constante a parasitas, conforme demonstrado em estudos anteriores (MEDEIROS *et al.*, 2013; PRATT-RICCIO *et al.*, 2017).

É importante notar que 60% dos participantes do nosso estudo com resultados positivos tinham anticorpos de uma única espécie contra MSP1₁₉, endossando que as respostas de anticorpos IgG aos antígenos MSP1 da malária utilizados parecem ser específicas da espécie (PRIEST *et al.*, 2018).

As possíveis combinações de anticorpos foram analisadas a fim de se obter informações sobre a ocorrência combinada de anticorpos específicos contra *P. malariae*. Interessantemente, o reconhecimento dos cinco fragmentos combinados foi formado por amostras com índices de reatividade médios. No entanto, PmMSP1_{F1} e PmMSP1_{F3} foram reconhecidos isoladamente em alta frequência, mostrando a necessidade de usar os vários domínios de PmMSP1 em combinação durante levantamentos sorológicos, com foco nesta espécie. Analisando os dezoito padrões de reconhecimento obtidos, a proteína PmMSP1_{F1} está presente em 50% deles, o que pode indicar a imunogenicidade potencialmente elevada deste fragmento da MSP1 de *P. malariae*, como já foi demonstrado para a MSP1 de *P. vivax* e *P. falciparum* (CASSIANO *et al.*, 2016; NOGUEIRA *et al.*, 2006; STORTI-MELO *et al.*, 2011; YUEN *et al.*, 2007).

Na Região Amazônica, casos de *P. malariae* raramente são identificados (CARLOS *et al.*, 2019). No entanto, nossos resultados indicam uma prevalência desse parasita em 5% das infecções mistas que ocorrem na Amazônia. Com a atual predominância de *P. vivax* e ainda uma certa prevalência de *P. falciparum*, combinada com baixa parasitemia e todas as dificuldades em diagnosticar *P. malariae*, não é surpreendente que as infecções por *P. malariae* tenham sido negligenciadas nesta área. Embora não seja tão clinicamente relevante, tem se notado que doadores de sangue com infecção assintomática por *P. malariae* podem ser reservatórios de malária transmitida por transfusão (ASCHAR *et al.*, 2020) e a vigilância sorológica através do ensaio multiplex com *beads* (MBA) oferece uma excelente oportunidade para uma identificação robusta de regiões onde este parasita pode ser endêmico. Alternativamente, as proteínas recombinantes PmMSP1 podem ser úteis para o diagnóstico específico de espécie de *P. malariae* no diagnóstico de malária de rotina por testes de diagnóstico rápido (RDTs), que atualmente têm como alvo *P. falciparum* e outras espécies de *Plasmodium* são identificadas como "pan-espécies" (WHO, 2009).

6. CONCLUSÕES

Este estudo desenvolve um ensaio de multiplex *in house* com sete proteínas recombinantes baseadas na MSP1 de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* para detecção de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra essas proteínas em humanos e primatas não-humanos, demonstrando que essas proteínas são importantes ferramentas para inquéritos soroepidemiológicos. Por fim, a prevalência de anticorpos contra *P. vivax* e *P. malariae/P. brasilianum* (e *P. falciparum* na Região Amazônica) em macacos de vida livre ou cativos suporta a hipótese de que esses animais são potenciais reservatórios nas duas regiões de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, F. V. S. de; SANTOS, E. dos; MELLO, A. R. L.; GOMES, L. R.; ALVARENGA, D. A. M. de; GOMES, M. Q.; VARGAS, W. P.; BIANCO-JÚNIOR, C.; PINA-COSTA, A. de; TEIXEIRA, D. S.; ROMANO, A. P. M.; MANSO, P. P. de A.; PELAJO-MACHADO, M.; BRASIL, P.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; BRITO, C. F. A. de; FERREIRA-DA-CRUZ, M. de F.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Howler monkeys are the reservoir of malarial parasites causing zoonotic infections in the Atlantic forest of Rio de Janeiro. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 12, p. e0007906, 9 dez. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007906>.
- ALVARENGA, D. A. M.; PINA-COSTA, A.; BIANCO, C.; MOREIRA, S. B.; BRASIL, P.; PISSINATTI, A.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; BRITO, C. F. A. New potential *Plasmodium brasilianum* hosts: tamarin and marmoset monkeys (family Callitrichidae). **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 71, dez. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1724-0>.
- ALVARENGA, D. A. M.; PINA-COSTA, A.; DE SOUSA, T.; PISSINATTI, A.; ZALIS, M. G.; SUARÉZ-MUTIS, M. C.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; BRASIL, P.; DANIEL-RIBEIRO, C.; DE BRITO, C. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 81, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0606-6>.
- AMANFO, S. A.; MDULUZA, T.; MIDZI, N.; CAVANAGH, D. R.; MUTAPI, F. Seroepidemiology of *Plasmodium* species infections in Zimbabwean population. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 267, 10 maio 2016. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1325-3>.
- ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; MILAZZO, L.; CORBELLINO, M. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. e2012013, 9 mar. 2012. <https://doi.org/10.4084/mjhid.2012.013>.
- ARAÚJO, M. S.; MESSIAS, M. R.; FIGUEIRÓ, M. R.; GIL, L. H. S.; PROBST, C. M.; VIDAL, N. M.; KATSURAGAWA, T. H.; KRIEGER, M. A.; PEREIRA DA SILVA, L. H.; OZAKI, L. S. Natural *Plasmodium* infection in monkeys in the state of Rondônia (Brazilian Western Amazon). **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 180, 2013. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-180>.
- ASCHAR, M.; LEVI, J. E.; FARINAS, M. L. R. N.; MONTEBELLO, S. C.; MENDRONE-JUNIOR, A.; DI SANTI, S. M. The hidden *Plasmodium malariae* in blood donors: a risk coming from areas of low transmission of malaria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, p. e100, 2020. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202062100>.
- ASSEFA, A.; ALI AHMED, A.; DERESSA, W.; SIME, H.; MOHAMMED, H.; KEBEDE, A.; SOLOMON, H.; TEKA, H.; GURRALA, K.; MATEI, B.; WAKEMAN, B.; WILSON, G. G.; SINHA, I.; MAUDE, R. J.; ASHTON, R.; COOK, J.; SHI, Y. P.; DRAKELEY, C.; VON SEIDLEIN, L.; ... HWANG, J. Multiplex serology demonstrate cumulative prevalence and spatial distribution of malaria in Ethiopia. **Malaria Journal**, v. 18, 22 jul. 2019. DOI 10.1186/s12936-019-2874-z.

ASSIS, G. M. P. de; ALVARENGA, D. A. M. de; COSTA, D. C.; SOUZA JUNIOR, J. C. de; HIRANO, Z. M. B.; KANO, F. S.; SOUSA, T. N. de; BRITO, C. F. A. de. Detection of *Plasmodium* in faeces of the New World primate *Alouatta clamitans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 9, p. 570–576, 25 ago. 2016. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160222>.

BIRKENMEYER, L.; MUERHOFF, A. S.; DAWSON, G. J.; DESAI, S. M. Isolation and Characterization of the MSP1 Genes from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 6, p. 996–1003, 1 jun. 2010. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0022>.

BLACKMAN, M. Proteases Involved in Erythrocyte Invasion by the Malaria Parasite Function and Potential as Chemotherapeutic Targets. **Current Drug Targets**, v. 1, n. 1, p. 59–83, 1 jul. 2000. <https://doi.org/10.2174/1389450003349461>.

BLACKMAN, M. J.; HEIDRICH, H. G.; DONACHIE, S.; MCBRIDE, J. S.; HOLDER, A. A. 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**, v. 172, n. 1, p. 379–382, 1 jul. 1990. <https://doi.org/10.1084/jem.172.1.379>.

BOUSEMA, T.; OKELL, L.; FELGER, I.; DRAKELEY, C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 12, p. 833–840, dez. 2014. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3364>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRASIL, P.; ZALIS, M. G.; DE PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A. M.; JÚNIOR, C. B.; SILVA, S.; AREAS, A. L. L.; PELAJO-MACHADO, M.; DE ALVARENGA, D. A. M.; DA SILVA SANTELLI, A. C. F.; ALBUQUERQUE, H. G.; CRAVO, P.; SANTOS DE ABREU, F. V.; PETERKA, C. L.; ZANINI, G. M.; SUÁREZ MUTIS, M. C.; PISSINATTI, A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DE BRITO, C. F. A.; FERREIRA-DA-CRUZ, M.F.; CULLETON, R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, out. 2017. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30333-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30333-9).

BUENO, Marina G.; ROHE, F.; KIRCHGATTER, K.; DI SANTI, S. M. F.; GUIMARÃES, L. O.; WITTE, C. L.; COSTA-NASCIMENTO, M. J.; TONIOLO, C. R. C.; CATÃO-DIAS, J. L. Survey of *Plasmodium* spp. in Free-Ranging Neotropical Primates from the Brazilian Amazon Region impacted by Anthropogenic Actions. **EcoHealth**, v. 10, n. 1, p. 48–53, mar. 2013. <https://doi.org/10.1007/s10393-012-0809-z>.

BUENO, Marina Galvão. **Pesquisa de *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp. em primatas neotropicais provenientes de regiões de Mata Atlântica e Amazônia impactadas por ações antrópicas: investigação in situ e ex situ**. 2012. Doutorado em Patologia Experimental e Comparada – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. DOI 10.11606/T.10.2012.tde-11102012-142919.

BUENO, M. G.; CATÃO-DIAS, J. L.; DE OLIVEIRA LAROQUE, P.; ARRUDA VASCONCELLOS, S.; FERREIRA NETO, J. S.; GENNARI, S. M.; FERREIRA, F.; LAURENTI, M. D.; UMEZAWA, E. S.; KESPER, N.; KIRCHGATTER, K.; OLIVEIRA GUIMARÃES, L.; PAVANATO, H. J.; VALENÇA-MONTENEGRO, M. M. Infectious Diseases in Free-Ranging Blonde Capuchins, *Sapajus flavius*, in Brazil. **International Journal of Primatology**, v. 38, n. 6, p. 1017–1031, dez. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10764-017-9994-5>.

BUERY, J. C.; DE ALENCAR, F. E. C. de; DUARTE, A. M. R. de C.; LOSS, A. C.; VICENTE, C. R.; FERREIRA, L. M.; FUX, B.; MEDEIROS, M. M.; CRAVO, P.; AREZ, A. P.; CERUTTI JUNIOR, C. Atlantic Forest Malaria: A Review of More than 20 Years of Epidemiological Investigation. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 132, 8 jan. 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010132>.

BUERY, J. C.; RODRIGUES, P. T.; NATAL, L.; SALLA, L. C.; LOSS, A. C.; VICENTE, C. R.; REZENDE, H. R.; DUARTE, A. M. R. de C.; FUX, B.; MALAFRONTA, R. dos S.; FALQUETO, A.; CERUTTI, C. Mitochondrial genome of *Plasmodium vivax/simium* detected in an endemic region for malaria in the Atlantic Forest of Espírito Santo state, Brazil: do mosquitoes, simians and humans harbour the same parasite? **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 437, dez. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-2080-9>.

CARLOS, B. C.; RONA, L. D. P.; CHRISTOPHIDES, G. K.; SOUZA-NETO, J. A. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, v. 113, n. 1, p. 1–13, fev. 2019. <https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1581463>.

CASSIANO, G. C.; FURINI, A. A. C.; CAPOBIANCO, M. P.; STORTI-MELO, L. M.; ALMEIDA, M. E.; BARBOSA, D. R. L.; PÓVOA, M. M.; NOGUEIRA, P. A.; MACHADO, R. L. D. Immunogenetic markers associated with a naturally acquired humoral immune response against an N-terminal antigen of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP-1). **Malaria Journal**, v. 15, 3 jun. 2016. DOI 10.1186/s12936-016-1350-2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4891883/>. Acesso em: 25 maio 2021.

CAVANAGH, D. R.; DODOO, D.; HVIID, L.; KURTZHALS, J. A. L.; THEANDER, T. G.; AKANMORI, B. D.; POLLEY, S.; CONWAY, D. J.; KORAM, K.; MCBRIDE, J. S. Antibodies to the N-Terminal Block 2 of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 Are Associated with Protection against Clinical Malaria. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6492–6502, nov. 2004. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6492-6502.2004>.

CAVANAGH, D. R.; MCBRIDE, J. S. Antigenicity of recombinant proteins derived from *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 197–211, 1 abr. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02826-5](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02826-5).

CAVASINI, M. T. V.; RIBEIRO, W. L.; KAWAMOTO, F.; FERREIRA, M. U. How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondônia, Western Brazilian Amazon? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 489–492, out. 2000. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822000000500011>.

CHEAVEAU, J.; MOGOLLON, D. C.; MOHON, M. A. N.; GOLASSA, L.; YEWHALAW, D.; PILLAI, D. R. Asymptomatic malaria in the clinical and public health context. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 17, n. 12, p. 997–1010, 2 dez. 2019. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1693259>.

CHEONG, F. W.; LAU, Y. L.; FONG, M. Y.; MAHMUD, R. Evaluation of Recombinant *Plasmodium knowlesi* Merozoite Surface Protein-133 for Detection of Human Malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 5, p. 835–840, 1 maio 2013. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0250>.

COATNEY, G. R.; COLLINS, W. E.; WARREN, M.; CONTACOS, P. G. **The primate malarias**. Bethesda, MD.: National Institutes of Health, 1971.

COCHRANE, A. H.; COLLINS, W. E.; NUSSENZWEIG, R. S. Monoclonal antibody identifies circumsporozoite protein of *Plasmodium malariae* and detects a common epitope on *Plasmodium brasilianum* sporozoites. **Infection and Immunity**, v. 45, n. 3, p. 592–595, set. 1984. <https://doi.org/10.1128/iai.45.3.592-595.1984>.

COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M. *Plasmodium malariae*: Parasite and Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 579–592, out. 2007. <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-07>.

CONWAY, D. J.; CAVANAGH, D. R.; TANABE, K.; ROPER, C.; MIKES, Z. S.; SAKIHAMA, N.; BOJANG, K. A.; ODUOLA, A. M. J.; KREMSNER, P. G.; ARNOT, D. E.; GREENWOOD, B. M.; MCBRIDE, J. S. A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses. **Nature Medicine**, v. 6, n. 6, p. 689–692, jun. 2000. <https://doi.org/10.1038/76272>.

COSTA, D. C.; CUNHA, V. P. da; ASSIS, G. M. P. de; SOUZA JUNIOR, J. C. de; HIRANO, Z. M. B.; ARRUDA, M. E. de; KANO, F. S.; CARVALHO, L. H.; BRITO, C. F. A. de. *Plasmodium simium/Plasmodium vivax* infections in southern brown howler monkeys from the Atlantic Forest. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 641–653, 5 ago. 2014. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130578>.

COSTA, E. M. F.; AMADOR, E. C. C.; SILVA, E. S.; ALVARENGA, C. O.; PEREIRA, P. E.; PÓVOA, M. M.; CUNHA, M. G. Malaria transmission and individual variability of the naturally acquired IgG antibody against the *Plasmodium vivax* blood-stage antigen in an endemic area in Brazil. **Acta Tropica**, v. 209, p. 105537, set. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105537>.

COWAN, G. J. M.; BOCKAU, U.; ELENI-MUUS, J.; ALDAG, I.; SAMUEL, K.; CREASEY, A. M.; HARTMANN, M. W. W.; CAVANAGH, D. R. A Novel Malaria Vaccine Candidate Antigen Expressed in *Tetrahymena thermophila*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 29 jan. 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0087198.

COWAN, G. J. M.; CREASEY, A. M.; DHANASARNASOMBUT, K.; THOMAS, A. W.; REMARQUE, E. J.; CAVANAGH, D. R. A Malaria Vaccine Based on the Polymorphic Block 2 Region of MSP-1 that Elicits a Broad Serotype-Spanning Immune Response. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 26 out. 2011. DOI 10.1371/journal.pone.0026616.

CURADO, I.; DOS SANTOS MALAFRANTE, R.; DE CASTRO DUARTE, A. M. R.; KIRCHGATTER, K.; BRANQUINHO, M. S.; BIANCHI GALATI, E. A. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Acta Tropica**, v. 100, n. 1–2, p. 54–62, nov. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.09.010>.

CURADO, I.; DUARTE, A. M. R.; LAL, A. A.; OLIVEIRA, S. G.; KLOETZEL, J. K. Antibodies anti Bloodstream and Circumsporozoite Antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*/*P. brasilianum*) in Areas of Very Low Malaria Endemicity in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 235–243, mar. 1997. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761997000200017>.

DE OLIVEIRA, C. I.; WUNDERLICH, G.; LEVITUS, G.; SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M.; TSUJI, M.; DEL PORTILLO, H. A. Antigenic properties of the merozoite surface protein 1 gene of *Plasmodium vivax*. **Vaccine**, v. 17, n. 23–24, p. 2959–2968, ago. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00176-0](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00176-0).

DEANE, L. M. Simian malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. suppl 3, p. 1–20, 1992. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000700001>.

DEL PORTILLO, H. A.; LEVITUS, G.; CAMARGO, L. M. A.; FERREIRA, M. U.; MERTENS, F. Human IgG responses against the N-terminal region of Merozoite Surface Protein 1 of *Plasmodium vivax*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 77–84, 1992. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761992000700010>.

DEVI, Y. S.; MUKHERJEE, P.; YAZDANI, S. S.; SHAKRI, A. R.; MAZUMDAR, S.; PANDEY, S.; CHITNIS, C. E.; CHAUHAN, V. S. Immunogenicity of *Plasmodium vivax* combination subunit vaccine formulated with human compatible adjuvants in mice. **Vaccine**, v. 25, n. 28, p. 5166–5174, 9 jul. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.04.080>.

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired Immunity to Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 13–36, jan. 2009. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-08>.

DRAKELEY, C. J.; CORRAN, P. H.; COLEMAN, P. G.; TONGREN, J. E.; MCDONALD, S. L. R.; CARNEIRO, I.; MALIMA, R.; LUSINGU, J.; MANJURANO, A.; NKYA, W. M. M.; LEMNGE, M. M.; COX, J.; REYBURN, H.; RILEY, E. M. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 14, p. 5108–5113, 5 abr. 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408725102>.

DUARTE, Ana Maria R. de C.; PORTO, M. A. L.; CURADO, I.; MALAFRANTE, R. S.; HOFFMANN, E. H. E.; OLIVEIRA, S. G.; SILVA, A. M. J.; KLOETZEL, J. K.; GOMES, A. de C. Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. **Journal of Medical Primatology**, v. 35, n. 2, p. 87–96, abr. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2006.00148.x>.

DUARTE, A. M. R. C.; MALAFRONTTE, R. S.; CERUTTI, C.; CURADO, I.; DE PAIVA, B. R.; MAEDA, A. Y.; YAMASAKI, T.; SUMMA, M. E. L.; NEVES, D. do V. D. de A.; DE OLIVEIRA, S. G.; GOMES, A. C. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: Reservoirs for human infections? **Acta Tropica**, v. 107, n. 2, p. 179–185, ago. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.05.020>.

ELIZARDEZ, Y. B.; FOTORAN, W. L.; JUNIOR, A. J. G.; CURADO, I.; JUNIOR, N. K.; MONTEIRO, E. F.; ROMERO NETO, I.; WUNDERLICH, G.; KIRCHGATTER, K. Recombinant proteins of *Plasmodium malariae* merozoite surface protein 1 (PmMSP1): Testing immunogenicity in the BALB/c model and potential use as diagnostic tool. **PLOS ONE**, v. 14, n. 7, p. e0219629, 25 jul. 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219629>.

ESCALANTE, A. A.; BARRIO, E.; AYALA, F. J. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. **Mol Biol Evol.**, , p. 616–626, 1995. .

FANDEUR, T.; VOLNEY, B.; PENEAU, C.; DE THOISY, B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum* / *P. malariae* malaria. **Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 11–21, jan. 2000. <https://doi.org/10.1017/S0031182099005168>.

FELEKE, S. M.; BRHANE, B. G.; MAMO, H.; ASSEFA, A.; WOYESSA, A.; OGAWA, G. M.; CAMA, V. Sero-identification of the aetiologies of human malaria exposure (*Plasmodium* spp.) in the Limu Kossa District of Jimma Zone, South western Ethiopia. **Malaria Journal**, v. 18, 27 ago. 2019. DOI 10.1186/s12936-019-2927-3.

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. 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**, v. 9, n. 1, p. 29, 2010. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-29>.

FIGUEIREDO, M. A. P.; DI SANTI, S. M. F.; FIGUEIREDO, T. A. P.; MACHADO, R. Z. Natural *Plasmodium* infection in neotropical primates in the island of São Luís, state of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 122–128, jun. 2015. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612015034>.

FINNEY, O. C.; RILEY, E. M.; WALTHER, M. Regulatory T cells in malaria – friend or foe? **Trends in Immunology**, v. 31, n. 2, p. 63–70, fev. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.12.002>.

FONSECA, F. Plasmódio de primata do Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 49, n. 0, p. 543–551, mar. 1951. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761951000100008>.

GÓMEZ, A.; AGUIRRE, A. A. Infectious Diseases and the Illegal Wildlife Trade. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, n. 1, p. 16–19, dez. 2008. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.046>.

GONDER, R.; VON BERENBERG-GOSSLER, H. Untersuchungen über malaria-plasmodien der affen. **Malaria Intern. Archiv. (Leipzig)**. v. 1, p. 47–50, 1908.

GUIMARÃES, L.O.; BAJAY, M. M.; WUNDERLICH, G.; BUENO, M. G.; RÖHE, F.; CATÃO-DIAS, J. L.; NEVES, A.; MALAFRONTTE, R. S.; CURADO, I.; KIRCHGATTER, K. The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil. **Acta Tropica**, v. 124, n. 1, p. 27–32, out. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.05.016>.

GUIMARÃES, L. O.; WUNDERLICH, G.; ALVES, J. M. P.; BUENO, M. G.; RÖHE, F.; CATÃO-DIAS, J. L.; NEVES, A.; MALAFRONTTE, R. S.; CURADO, I.; DOMINGUES, W.; KIRCHGATTER, K. Merozoite surface protein-1 genetic diversity in *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, 16 nov. 2015. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1238-8>.

HANSEN, D. S.; SCHOFIELD, L. Natural Regulatory T Cells in Malaria: Host or Parasite Allies? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. e1000771, 29 abr. 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000771>.

HOLDER, A. A. The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria. **Parasitology**, v. 136, n. 12, p. 1445–1456, out. 2009. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990515>.

HOLDER, A. A.; FREEMAN, R. R. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. **Journal of Experimental Medicine**, v. 156, n. 5, p. 1528–1538, 1 nov. 1982. <https://doi.org/10.1084/jem.156.5.1528>.

HOLDER, A. A.; GUEVARA PATIÑO, J. A.; UTHAIPIBULL, C.; SYED, S. E.; LING, I. T.; SCOTT-FINNIGAN, T.; BLACKMAN, M. Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria. **Parassitologia**, p. 409–414, 1999.

JIANG, G.; DAUBENBERGER, C.; HUBER, W.; MATILE, H.; TANNER, M.; PLUSCHKE, G. Sequence diversity of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* in clinical isolates from the Kilombero District, Tanzania. **Acta Tropica**, v. 74, n. 1, p. 51–61, 5 jan. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(99\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(99)00045-5).

KIRCHGATTER, K.; NOGUEIRA, S. L.; PADILHA, A.; CURADO, I.; BOULOS, M.; DI SANTI, S. M. Lethal malaria caused by *Plasmodium malariae* in an asplenic patient in Brazil. **British Medical Journal**, 2005. Disponível em: <http://bmj.bmjournals.com/cgi/eletters/331/7516/576b>.

KITCHEN, A. D.; CHIODINI, P. L. Malaria and blood transfusion. **Vox Sanguinis**, v. 90, n. 2, p. 77–84, fev. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2006.00733.x>.

KOCK, R. A.; WOODFORD, M. H.; ROSSITER, P. B. Disease risks associated with the translocation of wildlife: -EN- -FR- Risques sanitaires associés aux transferts de faune sauvage -ES- Riesgos sanitarios ligados a la traslocación de animales salvajes. **Revue Scientifique et Technique de l'OIIE**, v. 29, n. 2, p. 329–350, 1 ago. 2010. <https://doi.org/10.20506/rst.29.2.1980>.

KUMAR, A. Some considerable issues concerning malaria elimination in India. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 56, n. 1, p. 25, 2019. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.257770>.

LABADIE-BRACHO, M. Y.; VAN GENDEREN, F. T.; ADHIN, M. R. Malaria serology data from the Guiana shield: first insight in IgG antibody responses to *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* antigens in Suriname. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, p. 360, dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03434-y>.

LAL, A. A.; DE LA CRUZ, V. F.; COLLINS, W. E.; CAMPBELL, G. H.; PROCELL, P. M.; MCCUTCHAN, T. F. Circumsporozoite protein gene from *Plasmodium brasilianum*. Animal reservoirs for human malaria parasites? **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 12, p. 5495–5498, 25 abr. 1988. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)60590-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)60590-3).

LECLERC, M. C.; DURAND, P.; GAUTHIER, C.; PATOT, S.; BILLOTTE, N.; MENEGON, M.; SEVERINI, C.; AYALA, F. J.; RENAUD, F. Meager genetic variability of the human malaria agent *Plasmodium vivax*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 40, p. 14455–14460, 5 out. 2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405186101>.

LIM, C. S.; TAZI, L.; AYALA, F. J. *Plasmodium vivax*: Recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15523–15528, 25 out. 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507413102>.

LONGACRE, S.; MENDIS, K. N.; DAVID, P. H. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 64, n. 2, p. 191–205, 1 abr. 1994. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)00002-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)00002-6).

MARQUES, G. R. A. M.; CONDINO, M. L. F.; SERPA, L. L. N.; CURSINO, T. V. M. Aspectos epidemiológicos de malária autóctone na mata atlântica, litoral norte, Estado de São Paulo, 1985 - 2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 386–389, ago. 2008. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000400012>.

MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 1–2, p. 51–60, jan. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00808.x>.

MAWILI-MBOUMBA, D. P.; BORRMANN, S.; CAVANAGH, D. R.; MCBRIDE, J. S.; MATSIEGUI, P.-B.; MISSINOU, M. A.; KREMSNER, P. G.; NTOUMI, F. Antibody Responses to *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein–1 and Efficacy of Amodiaquine in Gabonese Children with *P. falciparum* Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 7, p. 1137–1141, 1 abr. 2003. <https://doi.org/10.1086/368414>.

MCBRIDE, J. S.; HEIDRICH, H.-G. Fragments of the polymorphic Mr 185 000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 23, n. 1, p. 71–84, 1 fev. 1987. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(87\)90189-7](https://doi.org/10.1016/0166-6851(87)90189-7).

MEDEIROS, M. M.; FOTORAN, W. L.; DALLA MARTHA, R. C.; KATSURAGAWA, T. H.; PEREIRA DA SILVA, L. H.; WUNDERLICH, G. Natural antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens MSP5, MSP9 and EBA175 is associated to clinical protection in the Brazilian Amazon. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 608, dez. 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-608>.

MILLER, L. H.; ROBERTS, T.; SHAHABUDDIN, M.; MCCUTCHAN, T. F. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 59, n. 1, p. 1–14, 1 maio 1993. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90002-F](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90002-F).

MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. de V. em S. Boletim Epidemiológico - Dia mundial de luta contra a malária. v. 52, n. 15, abr. 2021. .

MITTERMEIER, R. A. Primate Diversity and the Tropical Forest Case Studies from Brazil and Madagascar and the Importance of the Megadiversity Countries. *In*: WILSON, E. O.; PETER, F. M. **Biodiversity**. Washington, DC, USA: National Academy Press, 1988. p. 145–154.

MITTERMEIER, R. A.; COIMBRA-FILHO, A. F.; KIERULFF, M. C. M.; RYLANDS, A. B.; MENDES, S. L.; PISSINATTI, A.; ALMEIDA, L. M. **Monkeys of the Atlantic Forest of Eastern Brazil: Pocket Identification Guide**. Arlington, VA, USA: Conservation International, 2007(Conservation International Tropical Pocket Guide Series, 3).

MUERHOFF, A. S.; BIRKENMEYER, L. G.; COFFEY, R.; DILLE, B. J.; BARNWELL, J. W.; COLLINS, W. E.; SULLIVAN, J. S.; DAWSON, G. J.; DESAI, S. M. Detection of *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, and *P. malariae* Merozoite Surface Protein 1-p19 Antibodies in Human Malaria Patients and Experimentally Infected Nonhuman Primates. **Clinical and Vaccine Immunology: CVI**, v. 17, n. 10, p. 1631–1638, out. 2010. <https://doi.org/10.1128/CVI.00196-10>.

MULTINI, L. C.; MARRELLI, M. T.; BEIER, J. C.; WILKE, A. B. B. Increasing Complexity Threatens the Elimination of Extra-Amazonian Malaria in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 6, p. 383–387, jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.03.009>.

NOGUEIRA, P. A.; PIOVESAN ALVES, F.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; PEIN, O.; RODRIGUES SANTOS, N.; PEREIRA DA SILVA, L. H.; PLESSMAN CAMARGO, E.; DEL PORTILLO, H. A. 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**, v. 74, n. 5, p. 2726–2733, maio 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.5.2726-2733.2006>.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, p. 115, 30 abr. 2010. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-115>.

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. Blood-stage

Plasmodium vivax antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0207244, 12 nov. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207244>.

PLANSON, A.-G.; GUIJARRO, J. I.; CHAFFOTTE, A. F. New Insights for Native Production of MSP119, the Disulfide-Rich C-Terminal Fragment from *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e57086, 22 fev. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057086>.

PLUCINSKI, M. M.; CANDRINHO, B.; CHAMBE, G.; MUCHANGA, J.; MUGUANDE, O.; MATSINHE, G.; MATHE, G.; ROGIER, E.; DOYLE, T.; ZULLIGER, R.; COLBORN, J.; SAIFODINE, A.; LAMMIE, P.; PRIEST, J. W. Multiplex serology for impact evaluation of bed net distribution on burden of lymphatic filariasis and four species of human malaria in northern Mozambique. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006278, 14 fev. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006278>.

POLLEY, S. D.; TETTEH, K. K. A.; CAVANAGH, D. R.; PEARCE, R. J.; LLOYD, J. M.; BOJANG, K. A.; OKENU, D. M. N.; GREENWOOD, B. M.; MCBRIDE, J. S.; CONWAY, D. J. Repeat Sequences in Block 2 of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1 Are Targets of Antibodies Associated with Protection from Malaria. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 1833–1842, abr. 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.1833-1842.2003>.

PRATT-RICCIO, L. R.; DE SOUZA PERCE-DA-SILVA, D.; DA COSTA LIMA-JUNIOR, J.; PRATT RICCIO, E. K.; RIBEIRO-ALVES, M.; SANTOS, F.; ARRUDA, M.; CAMUS, D.; DRUILHE, P.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; BANIC, D. M. Synthetic Antigens Derived from *Plasmodium falciparum* Sporozoite, Liver, and Blood Stages: Naturally Acquired Immune Response and Human Leukocyte Antigen Associations in Individuals Living in a Brazilian Endemic Area. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1581–1592, 8 nov. 2017. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0359>.

PRIEST, J. W.; PLUCINSKI, M. M.; HUBER, C. S.; ROGIER, E.; MAO, B.; GREGORY, C. J.; CANDRINHO, B.; COLBORN, J.; BARNWELL, J. W. Specificity of the IgG antibody response to *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium ovale* MSP119 subunit proteins in multiplexed serologic assays. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 417, dez. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2566-0>.

PUNNATH, K.; DAYANAND, K. K.; MIDYA, V.; CHANDRASHEKAR, V. N.; ACHUR, R. N.; KAKKILAYA, S. B.; GHOSH, S. K.; KUMARI, S. N.; GOWDA, D. C. Acquired antibody responses against merozoite surface protein-119 antigen during *Plasmodium falciparum* and *P.vivax* infections in South Indian city of Mangaluru. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 45, n. 1, p. 176–190, mar. 2021. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01288-4>.

ROSA, D. S. **Imunogenicidade de proteínas recombinantes da superfície do merozoíta de *Plasmodium vivax*** candidatas à vacina contra a malária. 2006. Doutorado em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual: Vol. 2.** 2. ed. S.l.: Cold Spring Harbor, 1989.

SCHOLZEN, A.; MINIGO, G.; PLEBANSKI, M. Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 1, p. 16–25, jan. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.10.004>.

SCOPEL, K. K. G.; FONTES, C. J. F.; NUNES, Á. C.; HORTA, M. F.; BRAGA, É. M. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás—Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 61–64, mar. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.11.002>.

SERGENT, E.; PARROT, L. L'immunité, la prémunition et la résistance innée. **Arch. Inst. Pasteur**, Algerie, p. 13:279-319, 1935.

SILVA, T. R. M.; BARROS, F. N. L.; BAHIA, M.; SAMPAIO JUNIOR, F. D.; SANTOS, S. S. F.; INOUE, L. S.; GONÇALVES, T. S.; CHIESORIN NETO, L.; FARIA, D. C. L. O.; TOCHETTO, C.; VIANA, G. M. R.; MONTEIRO, F. O. B.; GÓES-CAVALCANTE, G.; SCOFIELD, A. *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection in Neotropical primates in the western Amazon, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 66, n. 7, p. 798–804, nov. 2019. <https://doi.org/10.1111/zph.12626>.

SILVA-NUNES, M. da; MALAFRONTA, R. dos S.; LUZ, B. de A.; SOUZA, E. A. de; MARTINS, L. C.; RODRIGUES, S. G.; CHIANG, J. O.; VASCONCELOS, P. F. da C.; MUNIZ, P. T.; FERREIRA, M. U. The Acre Project: the epidemiology of malaria and arthropod-borne virus infections in a rural Amazonian population. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 6, p. 1325–1334, jun. 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2006000600021>.

SOARES, I. S.; DA CUNHA, M. G.; SILVA, M. N.; SOUZA, J. M.; DEL PORTILLO, H. A.; RODRIGUES, M. M. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 3, p. 357–363, 1 mar. 1999. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.357>.

SOARES, I. S.; LEVITUS, G.; SOUZA, J. M.; DEL PORTILLO, H. A.; RODRIGUES, M. M. 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**, v. 65, n. 5, p. 1606–1614, maio 1997. <https://doi.org/10.1128/iai.65.5.1606-1614.1997>.

SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP119 expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*. **Parasitology**, v. 124, n. 3, p. 237–246, mar. 2002. <https://doi.org/10.1017/S003118200100110X>.

STEINHARDT, L. C.; RAVAOARISOA, E.; WIEGAND, R.; HARIMANANA, A.; HEDJE, J.; COTTE, A. H.; ZIGIRUMUGABE, S.; KESTEMAN, T.; RASOLOHARIMANANA, T. L.; RAKOTOMALALA, E.; RANDRIAMORAMANANA, A. M.; RAKOTONDAMANGA, J.-M.; RAZANATSIORIMALALA, S.; MERCEREAU-

PUIJALON, O.; PERRAUT, R.; RATSIMBASOA, A.; BUTTS, J.; ROGIER, C.; PIOLA, P.; RANDRIANARIVELOJOSIA, M.; VIGAN-WOMAS, I. School-Based Serosurveys to Assess the Validity of Using Routine Health Facility Data to Target Malaria Interventions in the Central Highlands of Madagascar. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 223, n. 6, p. 995–1004, 29 mar. 2021. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa476>.

STEWART, L.; GOSLING, R.; GRIFFIN, J.; GESASE, S.; CAMPO, J.; HASHIM, R.; MASIKA, P.; MOSHA, J.; BOUSEMA, T.; SHEKALAGHE, S.; COOK, J.; CORRAN, P.; GHANI, A.; RILEY, E. M.; DRAKELEY, C. Rapid Assessment of Malaria Transmission Using Age-Specific Sero-Conversion Rates. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e6083, 29 jun. 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006083>.

STORTI-MELO, L. M.; SOUZA-NEIRAS, W. C.; CASSIANO, G. C.; TAVEIRA, L. C.; CORDEIRO, A. J.; COUTO, V. S. C. A.; PÓVOA, M. M.; CUNHA, M. G.; ECHEVERRY, D. M.; ROSSIT, A. R. B.; ARÉVALO-HERRERA, M.; HERRERA, S.; MACHADO, R. L. D. Evaluation of the Naturally Acquired Antibody Immune Response to the Pv200L N-terminal Fragment of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 in Four Areas of the Amazon Region of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. Suppl 2, p. 58–63, 4 fev. 2011. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0044>.

TALAPKO; ŠKRLEC; ALEBIĆ; JUKIĆ; VČEV. Malaria: The Past and the Present. **Microorganisms**, v. 7, n. 6, p. 179, 21 jun. 2019. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060179>.

TAZI, L.; AYALA, F. J. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 209–221, 1 jan. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.08.007>.

VINETZ, J. M.; LI, J.; MCCUTCHAN, T. F.; KASLOW, D. C. *Plasmodium malariae* Infection in an Asymptomatic 74-Year-Old Greek Woman with Splenomegaly. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 6, p. 367–371, 5 fev. 1998. <https://doi.org/10.1056/NEJM199802053380605>.

WHO, W. H. O. **Malaria Rapid Diagnostic Test Performance – Results of WHO Product Testing of Malaria RDTs: Round 1 (2008)**. Geneva: World Health Organization, 2009.

WHO. World Health Organization. **World malaria report 2012: WHO global Malaria programme**. Geneva. 2012.

WHO. World Health Organization. **World malaria report 2020 - 20 years of global progress & challenges**. Geneva. 2020.

WIPASA, J.; SUPHAVILAI, C.; OKELL, L. C.; COOK, J.; CORRAN, P. H.; THAIKLA, K.; LIEWSAREE, W.; RILEY, E. M.; HAFALLA, J. C. R. Long-Lived Antibody and B Cell Memory Responses to the Human Malaria Parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, p. e1000770, 19 fev. 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000770>.

YAMASAKI, T.; DUARTE, A. M. R. C.; CURADO, I.; SUMMA, M. E. L.; NEVES, D. V. D. A.; WUNDERLICH, G.; MALAFRONTTE, R. S. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil: Detection of etiological agents of malaria. **Journal of Medical Primatology**, v. 40, n. 6, p. 392–400, dez. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2011.00498.x>.

YAZDANI, S.; MUKHERJEE, P.; CHAUHAN, V.; CHITNIS, C. Immune Responses to Asexual Blood-Stages of Malaria Parasites. **Current Molecular Medicine**, v. 6, n. 2, p. 187–203, 1 mar. 2006. <https://doi.org/10.2174/156652406776055212>.

YUEN, D.; LEUNG, W.-H.; CHEUNG, R.; HASHIMOTO, C.; NG, S. F.; HO, W.; HUI, G. Antigenicity and immunogenicity of the N-terminal 33-kDa processing fragment of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1, MSP1: Implications for vaccine development. **Vaccine**, v. 25, n. 3, p. 490–499, jan. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.07.053>.

APÊNDICE A - Artigo publicado na revista *Pathogens* sob o título “Naturally Acquired Humoral Immunity against Malaria Parasites in Non-Human Primates from the Brazilian Amazon, Cerrado and Atlantic Forest”. Monteiro *et al.*, 2020.



Article

Naturally Acquired Humoral Immunity against Malaria Parasites in Non-Human Primates from the Brazilian Amazon, Cerrado and Atlantic Forest

Eliana Ferreira Monteiro ¹, Carmen Fernandez-Becerra ^{2,3}, Maisa da Silva Araujo ⁴, Mariluce Rezende Messias ⁵, Luiz Shozo Ozaki ⁶, Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte ^{1,7}, Marina Galvão Bueno ⁸, Jose Luiz Catao-Dias ⁹, Carolina Romeiro Fernandes Chagas ^{10,11}, Bruno da Silva Mathias ¹, Mayra Gomes dos Santos ¹², Stéfanie Vanessa Santos ^{12,13}, Marcia Moreira Holcman ⁷, Julio Cesar de Souza Jr. ^{14,15} and Karin Kirchgatter ^{1,7,*}

¹ Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05403-000, Brazil; elianafmonteiro@usp.br (E.F.M.); amrcd2@gmail.com (A.M.R.d.C.D.); brunomathiasbio@gmail.com (B.d.S.M.)

² ISGlobal, Hospital Clínic—Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; carmen.fernandez@isglobal.org

³ Germans Trias i Pujol Health Science Research Institute (IGTP), 08916 Badalona, Spain

⁴ Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz Rondônia, Porto Velho, RO 76812-245, Brazil; maisaraujo@gmail.com

⁵ Departamento de Biologia, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO 78900-000, Brazil; messias.malu@gmail.com

⁶ Life Sciences, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23284, USA; lsozaki@vcu.edu

⁷ Departamento de Laboratórios Especializados, Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo, SP 01027-000, Brazil; marciaholcman@gmail.com

⁸ Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21040-900, Brazil; buenomg@gmail.com

⁹ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05508-270, Brazil; zecatao@usp.br

¹⁰ Departamento de Pesquisas Aplicadas, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo, SP 04301-905, Brazil; crfchagas@gmail.com

¹¹ Institute of Ecology, Nature Research Centre, Vilnius 08412, Lithuania

¹² Departamento de Patologia, Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, SP 01311-925, Brazil; mayra.santos_01@hotmail.com (M.G.d.S.); stefanie@stefanie.vet.br (S.V.S.)

¹³ Departamento de Anatomia Patológica, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, SP 01525-001, Brazil

¹⁴ Departamento de Medicina Veterinária, Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC 89012-900, Brazil; juliosouzarvet@gmail.com

¹⁵ Projeto Bugio, Centro de Pesquisas Biológicas, Indaial, SC 89130-000, Brazil

* Correspondence: karink@usp.br

Received: 30 May 2020; Accepted: 25 June 2020; Published: 29 June 2020



Abstract: Non-human primates (NHPs) have been shown to be infected by parasites of the genus *Plasmodium*, the etiological agent of malaria in humans, creating potential risks of zoonotic transmission. *Plasmodium brasilianum*, a parasite species similar to *P. malariae* of humans, have been described in NHPs from Central and South America, including Brazil. The merozoite surface protein 1 (MSP1), besides being a malaria vaccine candidate, is highly immunogenic. Due to such properties, we tested this protein for the diagnosis of parasite infection. We used recombinant proteins of *P. malariae* MSP1, as well as of *P. falciparum* and *P. vivax*, for the detection of antibodies anti-MSP1 of these parasite species, in the sera of NHPs collected in different regions of Brazil. About 40% of the NHP sera were confirmed as reactive to the proteins of one or more parasite species. A relatively higher number of reactive sera was found in animals from the Atlantic Forest than those from the Amazon region, possibly reflecting the former more intense parasite circulation among NHPs due to their proximity to humans at a higher populational density. The presence of *Plasmodium* positive NHPs

APÊNDICE B - Artigo publicado na revista *Pathogens* sob o título “Antibody Profile Comparison against MSP1 Antigens of Multiple *Plasmodium* Species in Human Serum samples from Two Different Brazilian Populations Using a Multiplex Serological Assay



Article

Antibody Profile Comparison against MSP1 Antigens of Multiple *Plasmodium* Species in Human Serum Samples from Two Different Brazilian Populations Using a Multiplex Serological Assay

Eliana Ferreira Monteiro ¹ , Carmen Fernandez-Becerra ^{2,3}, Izilda Curado ^{1,4}, Gerhard Wunderlich ⁵, Meire Ioshie Hiyane ⁶ and Karin Kirchgatter ^{1,4,*}

- ¹ Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo 05403-000, Brazil; elianafmonteiro@usp.br (E.F.M.); izcurado@gmail.com (I.C.)
² ISGlobal, Hospital Clínic—Universitat de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; carmen.fernandez@isglobal.org
³ Germans Trias i Pujol Health Science Research Institute (IGTP), 08916 Badalona, Spain
⁴ Departamento de Laboratórios Especializados, Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo 01027-000, Brazil
⁵ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; gwunder@usp.br
⁶ Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil; miy@icb.usp.br
 * Correspondence: karink@usp.br



Citation: Monteiro, E.F.; Fernandez-Becerra, C.; Curado, I.; Wunderlich, G.; Hiyane, M.I.; Kirchgatter, K. Antibody Profile Comparison against MSP1 Antigens of Multiple *Plasmodium* Species in Human Serum Samples from Two Different Brazilian Populations Using a Multiplex Serological Assay. *Pathogens* **2021**, *10*, 1138. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091138>

Academic Editor: Claude Saegerman

Received: 10 August 2021

Accepted: 1 September 2021

Published: 4 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Plasmodium malariae* has a wide geographic distribution, but mainly at very low parasitemias and in co-infections, leading to an underestimated prevalence of this species. Studies for the detection of antibodies against *Plasmodium* recombinant proteins are increasingly used to map geographical distributions, seroprevalence and transmission intensities of malaria infection. However, no seroepidemiological survey using recombinant *P. malariae* proteins has been conducted in Brazil. This work evaluated the antibody response in serum samples of individuals from endemic regions of Brazil (the Amazon region and Atlantic Forest) against five recombinant proteins of *P. malariae* merozoite surface protein 1 (MSP1), and the MSP1 C-terminal portions of *P. vivax* and *P. falciparum*, in a multiplex assay. The positivity was 69.5% of samples recognizing at least one MSP1 recombinant protein. The mean of the Reactivity Index for the C-terminal portion of the *P. falciparum* was significantly higher compared to the other recombinant proteins, followed by the C-terminal of *P. vivax* and the N-terminal of *P. malariae*. Among the recombinant *P. malariae* proteins, the N-terminal of *P. malariae* showed the highest Reactivity Index alone. This study validates the use of the multiplex assay to measure naturally acquired IgG antibodies against *Plasmodium* MSP1 proteins and demonstrate that these proteins are important tools for seroepidemiological surveys and could be used in malaria surveillance.

Keywords: malaria; *Plasmodium malariae*; MSP1; serology; Brazil; multiplex bead assay

1. Introduction

Plasmodium malariae is one of the oldest parasites that cause malaria in humans but is also one of the most neglected, probably due to their lower prevalence and disease severity, as compared to other human *Plasmodium* spp. [1]. However, *P. malariae* is widespread throughout sub-Saharan Africa, Southeast Asia, Indonesia, South America and on islands of the western Pacific [2]. Recently, a systematic review and meta-analysis study investigated the global trend of *P. malariae* infections in the last two decades, showing an overall seroprevalence of 2%, with the highest prevalence (3.16%) in the African region and the lowest prevalence (0.06%) in the Eastern Mediterranean region, whereas the American region had the second highest *P. malariae* prevalence (2.94%) [3].

ANEXO A – Parecer de Aprovação do Comitê de Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical (CEUA/281A)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132



São Paulo, 16 de Julho de 2014

Ilmo(a)
Dr(a). Karin Kirchgatter
(aos cuidados de Eliana Ferreira Monteiro)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **APROVOU**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/000281A 'Antigenicidade da Proteína de Superfície do Merozoítio 1 de Plasmodium malariae e Plasmodium brasilianum (PmMSP1 e PbMSP1) em infecções naturais de humanos e primatas não humanos'**, sob a sua responsabilidade.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

Com relação à parte do projeto que envolve utilização de material humano, a CEP-IMT tomou ciência, sendo que o projeto deverá ser enviado ao Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da USP, para aprovação.

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

ANEXO B – Carta de Aprovação do Adendo do Comitê de Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical (Adendo 60 - CEUA/281A)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
 CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
 Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132



São Paulo, 04 de Outubro de 2019

Ilmo(a)
Dr(a). Karin Kirchgatter
 (aos cuidados de Eliana Ferreira Monteiro)

Certificamos que o adendo da proposta intitulada "**Antigenicidade da Proteína de Superfície do Merozoíto 1 de Plasmodium malariae e Plasmodium brasilianum (PmMSP1 e PbMSP1) em infecções naturais de humanos e primatas não humanos**", registrada com o nº **000281A**, sob a responsabilidade de **Karin Kirchgatter** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei n. 11794, de 8 de outubro de 2008, do decreto n. 6899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-IMT) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião na presente data.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa.

Nova data de prorrogação do Projeto: **27/01/2021**

Atenciosamente,

Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

ANEXO C – Autorização para atividades com finalidade científica. SISBIO 44751-5



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44751-5	Data da Emissão: 19/03/2020 16:08:50	Data da Revalidação*: 01/02/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Karin Kirchgatter	CPF: 127.822.158-17
Título do Projeto: Antigenicidade da Proteína de Superfície do Merozoito 1 de Plasmodium malariae e Plasmodium brasilianum (PmMSP1 e PbMSP1) em infecções naturais de humanos e primatas não humanos	
Nome da Instituição: Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Clonagem em pGEM-T Easy Vector/pGEX	07/2014	12/2014
2	Análise por Bioplex	07/2015	12/2015
3	Produção das proteínas recombinantes	01/2015	06/2015
4	Análise por ELISA	01/2016	06/2016
5	Redação de relatório e artigo científico	07/2016	06/2017
6	Análise de dados	07/2015	12/2016
7	Coleta de amostras	07/2014	12/2015
8	Análise por Bioplex soros humanos	03/2019	07/2019
9	Análise por ELISA p19	08/2019	12/2019
10	Análise de dados humanos e ELISA	01/2020	12/2020
11	Redação de relatório e artigo científico soros humanos	07/2020	12/2020

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Cauê Monticelli	Biólogo Chefe Setor Mamíferos	345.940.738-75	Brasileira
2	Carolina Romeiro Fernandes Chagas	Bióloga Chefe do Laboratório de Análises Clínicas	324.700.598-60	Brasileira
3	Patrícia Locosque Ramos	Chefe da Divisão de Pesquisa Aplicada	263.190.078-26	Brasileira

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0447510520200319

Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44751-5	Data da Emissão: 19/03/2020 16:08:50	Data da Revalidação*: 01/02/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Karin Kirchgatter	CPF: 127.822.158-17
Título do Projeto: Antigenicidade da Proteína de Superfície do Merozoito 1 de Plasmodium malariae e Plasmodium brasilianum (PmMSP1 e PbMSP1) em infecções naturais de humanos e primatas não humanos	
Nome da Instituição: Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

Observações e ressalvas

1	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP).	São Paulo-SP	Mata Atlântica	Não	Fora de UC Federal

Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atividades ex-situ (fora da natureza)

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0447510520200319

Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44751-5	Data da Emissão: 19/03/2020 16:08:50	Data da Revalidação*: 01/02/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Karin Kirchgatter	CPF: 127.822.158-17
Título do Projeto: Antigenicidade da Proteína de Superfície do Merozoito 1 de Plasmodium malariae e Plasmodium brasilianum (PmMSP1 e PbMSP1) em infecções naturais de humanos e primatas não humanos	
Nome da Instituição: Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Primates	-

Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Primates)	Sangue
2	Método de captura/coleta (Primates)	Outros métodos de captura/coleta(As amostras de sangue já serao colhidas para exames de rotina no lab. de analises clinicas do Zoo)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Superintendência de Controle de Endemias	Outro

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0447510520200319

Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44751-5	Data da Emissão: 19/03/2020 16:08:50	Data da Revalidação*: 01/02/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Karin Kirchgatter	CPF: 127.822.158-17
Título do Projeto: Antigenicidade da Proteína de Superfície do Merozoito 1 de Plasmodium malariae e Plasmodium brasilianum (PmMSP1 e PbMSP1) em infecções naturais de humanos e primatas não humanos	
Nome da Instituição: Superintendência de Controle de Endemias	CNPJ: 43.142.397/0001-69

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de Amostra	Qtde.	Data

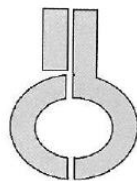
* Identificar o espécime do nível taxonômico possível.

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 0447510520200319

Página 4/4

ANEXO D – Parecer de Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH 020/2015)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEPSH. 020/2015

São Paulo, 19 de março de 2015.

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Gehard Wunderlich
Departamento de Parasitologia -ICB/USP

Prezado Senhor,

A Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, em reunião realizado em 18.03.2015, após análise do pedido de cadastramento do biorrepositório formado por "Amostras de Plasma" coletadas nos Projetos de pesquisa Aprovados com os PARECER 742/2006/CEP, PARECER N°741/2006, PARECER 196/2001 e PARECER 318/2002, decidiu por **aprová-lo**.

Informo que qualquer alteração na composição do biorepositório (tanto por inclusão de novas amostras ou exclusão de amostras) deve ser informada a esta Comissão para atualização do cadastro.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO A. M. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP