

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Coinfecção Epstein-Barr vírus e malária por *Plasmodium vivax*: influência
na resposta imune humoral malária-específica**

por

Michelle Hallais França Dias

Belo Horizonte

2022

MICHELLE HALLAIS FRANÇA DIAS

Coinfecção Epstein-Barr vírus e malária por *Plasmodium vivax*: influência na resposta imune humoral malária-específica

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração de Doenças Infecciosas e Parasitárias Crônicas não transmissíveis.

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Belo Horizonte

2022

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB 6 3740/00

D541c	Dias, Michelle Hallais Franca
Ano	Coinfecção Epstein-Barr vírus e malária por <i>Plasmodium vivax</i> : influência na resposta imune humoral malária-específica / Michelle Hallais França Dias – Belo Horizonte, 2022. XIV, 125 f.: il.;210 x 297mm. Bibliografia: f. 84 – 103 Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1. <i>Plasmodium vivax/parasitologia</i> 2. Malária 3. Epstein-Barr vírus I. Título. II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação). CDD – 22. ed. – 616.93

MICHELLE HALLAIS FRANÇA DIAS

Coinfecção Epstein-Barr vírus e malária por *Plasmodium vivax*: influência na resposta imune humoral malária-específica

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração de Doenças Infecciosas e Parasitárias Crônicas não transmissíveis.

Banca Examinadora

Dra. Luzia Helena Carvalho (IRR/FIOCRUZ) Presidente
Dra. Carla Claser(USP) Titular
Dr. Josué da Costa Lima Junior (IOC/FIOCRUZ) Titular
Dra. Jaqueline Germano de Oliveira (IRR/FIOCRUZ) Titular
Dr. Pedro Augusto Alves (IRR/FIOCRUZ) Titular
Dr. Gabriel Luiz Costa (IRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 30/05/2022.

*Ao querido Irineu Hallais França,
e a todos que fizeram e fazem parte desta caminhada,
dedico essa vitória.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me mostrar que a fé faz de qualquer obstáculo um degrau, e que assim a vida ganha um propósito;

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, pela oportunidade;

À FIOCRUZ pelo fornecimento da minha bolsa, e às demais agências, CAPES, CNPq, FAPEMIG e Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP) do IRR/FIOCRUZ, pela infraestrutura e recursos financeiros;

Às Drs. Luzia Helena Carvalho, Taís Nobrega de Souza, Flora Kano e Cristiana Brito pela orientação no desenvolvimento deste trabalho e pelos anos de ensinamentos e conselhos, fundamentais para meu amadurecimento profissional;

As plataformas de PCR em Tempo Real e Bioprospecção de produtos naturais, em especial as suas responsáveis Viviane Fernandes do Santos e Daniela Naback pelas instruções e paciência;

Aos colegas e amigas (os) do Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária pelas trocas diárias, necessárias para nossa jornada;

À minha família, amigas(os) e pets pela força e presença diária, que são o suporte fundamental para todas as minhas conquistas;

Em especial, ao meu querido avô Irineu, grande incentivador e apreciador do meu crescimento profissional: este título é para você. Saudade.

“O homem não procura se elevar acima do homem,
Mas acima de si mesmo, aperfeiçoando-se”.

(Allan Kardec)

“O coração inspira o cérebro. O cérebro dirige a existência.
A emoção cria a ideia. A ideia plasma as ações”.

(*Emmanuel*, por Chico Xavier)

RESUMO

A infecção simultânea do *Plasmodium falciparum* e do Epstein-Barrvírus (EBV) pode promover o desenvolvimento do agressivo linfoma de Burkitt endêmico (eBL) em crianças que vivem em áreas holoendêmicas para *P. falciparum*. Embora esteja estabelecido que o eBL parece não estar associado a outros parasitos da malária humana, o impacto da infecção por EBV na geração de imunidade à malária humana permanece em grande parte inexplorado. Considerando que este prevalente herpesvírus estabelece uma infecção nas células B que persistente ao longo da vida, nossa hipótese é que a coinfeção por EBV impacta nas respostas de anticorpos naturalmente adquiridas ao *P. vivax*, o parasita da malária humana mais difundido no mundo. O desenho deste estudo envolveu três cortes transversais com intervalos de seis meses (linha de base, 6 e 12 meses) entre adultos expostos ao *P. vivax* na Amazônia brasileira. O desenho experimental se concentrou em um grupo de indivíduos expostos à malária cujo EBV-DNA (amplificação do gene balf-5 por PCR em tempo real e PCR digital) foi detectado persistentemente no sangue periférico (PersV_{DNA}, n=27), e um grupo da mesma área, pareado por idade, cujo EBV-DNA não pôde ser detectado durante o seguimento (NegV_{DNA}, n=29); ambos os grupos foram comparáveis em relação as variáveis demográficas, parasitológicas e epidemiológicas. Durante o período de estudo, a detecção sorológica de anticorpos EBV (através da técnica de ELISA) para antígenos virais de fase lítica/latente (VCA-p18, ZEBRA, EAd-p45/52 e EBNA-1) mostrou que apenas anticorpos IgG para o antígeno do capsídeo viral (VCA) p18, foram significativamente diferentes entre os grupos (PersV_{DNA}>NegV_{DNA}). De fato, nos indivíduos estudados, os níveis anticorpos IgG anti-VCA18 foram associados com o número de cópias de EBV-DNA no sangue periférico. Um painel de antígenos de estágio sanguíneo de *P. vivax*, abrangendo uma ampla faixa de imunogenicidade (PvDEKnull2, PvDBPII, PvAMA-1, PvMSP1-19), confirmou que, em geral, o grupo PersV_{DNA} apresentou níveis baixos de anticorpos anti- *P. vivax* em comparação com NegV_{DNA}. Curiosamente, diferenças mais significativas foram observadas para um novo antígeno vacinal da *Duffy binding protein II* (DBPII), chamado DEKnull-2, que tem sido associado à resposta de anticorpos neutralizantes de longo prazo. As diferenças entre os grupos foram menos pronunciadas com antígenos de estágio sanguíneo (como MSP1-19) cujos níveis podem flutuar de acordo com a transmissão da malária. Em conclusão, neste estudo de prova de conceito, demonstrou-se pela primeira vez que uma detecção persistente de EBV-DNA no sangue periférico de população semi-imune ao *P. vivax* pode afetar a resposta imune de longo prazo às principais vacinas candidatas contra a malária. Estudos futuros fazem-se necessários para avaliar o papel da detecção persistente de EBV-DNA na resposta de longa duração das células B de memória para *P. vivax*.

Palavras-chave: malária, *Plasmodium vivax*, Epstein-Barr vírus, coinfeção, resposta de anticorpos, imunidade humoral.

ABSTRACT

The simultaneous infection of *Plasmodium falciparum* and Epstein-Barr virus (EBV) could promote the development of the aggressive endemic Burkitt's Lymphoma (eBL) in children living in *P. falciparum* holoendemic areas. While it is well-established that eBL seems not to be associated to other human malaria parasites, the impact of EBV infection on the generation of human malaria immunity remains largely unexplored. Considering that this highly prevalent herpesvirus establishes a lifelong persistent infection on B-cells, we hypothesized that EBV co-infection could have impact on the naturally acquired antibody responses to *P. vivax*, the most widespread human malaria parasite. The study design involved three cross-sectional surveys at six-month intervals (baseline, 6 and 12 months) among long-term *P. vivax* exposed adults living in the Amazon rainforest. The approach focused on a group of malaria-exposed individuals whose EBV-DNA (balf-5 gene amplification by real-time PCR and digital PCR) was persistently detected in the peripheral blood (PersV_{DNA}, n=27), and an age-matched malaria-exposed group whose EBV-DNA could not be detected during the follow-up (NegV_{DNA}, n=29); both groups were similar in terms of demographic, parasitological and epidemiological variables. During the follow-up period, the serological detection of EBV antibodies (ELISA assay) to lytic/ latent viral antigens (VCA-p18, ZEBRA, EA-d-p45/52 e EBNA-1) showed that only IgG antibodies to viral capsid antigen (VCA-p18) were significantly different between groups (PersV_{DNA}>NegV_{DNA}). In fact, in the study population the levels of VCA-p18 IgG antibodies were associated with the number of EBV-DNA copies in the peripheral blood. A panel of blood-stage *P. vivax* antigens covering a wide range of immunogenicity (PvDEKnull2, PvDBPII, PvAMA-1, PvMSP1-19), confirmed that in general PersV_{DNA} group showed low levels of anti-*P. vivax* antibodies as compared with NegV_{DNA}. Interestingly, more significant differences were observed to a novel Duffy binding protein II (DBPII) vaccine immunogen, named DEKnull-2, which has been associated with long-term neutralizing antibody response. Differences between groups were less pronounced with blood-stage antigens (such as MSP1-19) whose levels can fluctuate according to malaria transmission. In conclusion, in a proof-of-concept study, evidence was shown for the first time that persistent detection of EBV DNA in adult peripheral blood in a semi-immune population of *P. vivax* can affect the long-term immune response to major malaria vaccine candidates. Future studies are needed to assess the role of persistent EBV-DNA detection in the long-term memory B cells immune response to *P. vivax*.

Keywords: malaria, *Plasmodium vivax*, Epstein-Barr virus, co-infection, antibody response, humoral immunity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Países segundo status de casos autóctones em 2000	16
Figura 2 - Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2020	17
Figura 3 - Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2019.....	18
Figura 4 - Representação esquemática do ciclo do <i>Plasmodium</i> spp. no hospedeiro vertebrado humano	21
Figura 5 - Representação esquemática dos domínios estruturais da <i>Duffy Binding Protein</i> de <i>P. vivax</i>	26
Figura 6 - Representação esquemática dos protótipos vacinais da família DEKnull.....	29
Figura 7 - Representação esquemática do processo de montagem e processamento do complexo MSP1	30
Figura 8 - Representação esquemática da interação entre AMA-1 (verde) e o complexo RON (azul)	33
Figura 9 - Ciclo de vida do EBV, estágios de latência e linfomas derivados	40
Figura 10 - Esquema de resposta sorológica à infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV)	43
Figura 11 - Fluxograma referente ao desenho experimental do estudo para identificar a presença do vírus Epstein-Barr (EBV)	49
Figura 12 - Mapa do estado do Amazonas, região da Amazônia Legal, mostrando a localização do assentamento agrícola de Rio Pardo (representado pelo triângulo preto), localizado no município de Presidente Figueiredo (representado em roxo), a aproximadamente 160 km de Manaus	50
Figura 13 - Série temporal de casos de malária no assentamento agrícola de Rio Pardo (Amazonas, Brasil) durante o período de estudo (Bs: baseline; 6 meses; 12 meses)	51
Figura 14. Gráficos da curva TG-ROC estabelecidos para cada peptídeo utilizado no ensaio de ELISA para detecção de anticorpos de EBV.....	58
Figura 15 - Desenho esquemático do princípio da PCR digital (Adaptado de <i>oplef Digital PCR – Applications Guide – BioRad</i>)	59
Figura 16 - Frequência de anticorpos anti-EBV de acordo com o número de marcadores sorológicos reconhecidos pelos indivíduos cujo EBV-DNA pode ser	

detectado (PersVDNA) ou não (NegVDNA) ao longo do período de seguimento..... 63

Figura 17 - Variação temporal nos níveis de anticorpos IgG contra o antígeno capsídeo viral (VCA) do vírus Epstein-Barr em indivíduos com (PersVDNA) ou sem persistência do DNA viral (NegVDNA) durante o período do estudo (baseline, 6 e 12 meses) 64

Figura 18 - Resposta individual de anticorpos aos peptídeos do vírus Epstein-Barr (EBV) (VCA-p18, ZEBRA, EAd-p45/52 e EBNA-1) durante os cortes transversais 65

Figura 19 - Correlações pareadas entre os níveis de anticorpos EBV registrados em indivíduos com e sem DNA viral persistente durante as pesquias transversais 66

Figura 20 - Variação temporal nos níveis de anticorpos IgG contra DEKnull-2 de *P. vivax* em indivíduos com ou sem persistência do DNA viral durante o período do estudo (baseline, 6 e 12 meses) 67

Figura 21 - Variação temporal nos níveis de anticorpos IgG contra DBP II de *P. vivax* em indivíduos com ou sem persistência do DNA viral durante o período do estudo (baseline, 6 e 12 meses) 68

Figura 22 - Variação temporal nos níveis de anticorpos IgG contra MSP1-19 de *P. vivax* em indivíduos com ou sem persistência do DNA viral durante o período do estudo (baseline, 6 e 12 meses) 69

Figura 23 - Variação temporal nos níveis de anticorpos IgG contra AMA-1 de *P. vivax* em indivíduos com ou sem persistência do DNA viral durante o período do estudo (baseline, 6 e 12 meses) 70

Figura 24 - Correlações pareadas entre os níveis de anticorpos EBV e *P. vivax* em indivíduos com (PersVDNA) ou sem (NegVDNA) DNA viral persistente durante os inquéritos transversais 71

Figura 25 - Características da quantificação do DNA viral de EBV em indivíduos com detecção persistente do genoma viral 72

Figura 26 - Correlação entre o peptídeo de VCA-p18 e o DNA viral circulante, de EBV, nas amostras dos indivíduos com genoma viral persistente 73

Figura 27 - Correlação entre os níveis de anticorpos de *P. vivax* e número de cópias/ μ L de EBV-DNA circulante (“DNAmia”) nas amostras dos indivíduos com genoma viral persistente 74

Figura 28 - Resposta de anticorpos IgM e IgG contra peptídeos do vírus Epstein-Barr em crianças amazônicas ao longo do tempo..... 79

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resumo dos dados demográficos, clínicos e epidemiológicos dos indivíduos com história de longa exposição ao *P. vivax*, residentes na comunidade de Rio Pardo, Amazonas 53
- Tabela 2.** Resumo dos primers e sequências de sondas para PCR em tempo real para amplificação do gene BALF-5 do vírus Epstein-Barr 56
- Tabela 3.** Dados demográficos, epidemiológicos e parasitológicos de indivíduos expostos à malária cujo EBV-DNA pôde ser detectado (PerV_{DNA}) ou não (NegV_{DNA}) no sangue periférico durante o período de acompanhamento de 12 meses 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

AID – *Activation Induced Cytidine Deaminase* (Citidina Desaminase Induzida por Ativação)

BIABs– *Binding Inhibitory Antibodies* (anticorpos inibitórios)

BL – *Burkitt Lymphoma* (Linfoma de Burkitt)

BL - HIV – *Burkitt Lymphoma associated with HIV* (Linfoma de Burkitt associado ao HIV)

Brz-1 – Brazil -1 (Variante da proteína DBPII de *Plasmodium vivax*)

CCL-2 - *Chemokine (C-C motif) Ligand 2* (Ligante de quimiocina 2)

CD - *Cluster of differentiation* (Grupamento de diferenciação)

cMyC- *Cardiac myosin binding protection C* (Proteção de ligação à miosina cardíaca C)

COVID-19 - *(Co)rona (Vi)rus (D)isease*("doença do coronavírus" – o número 19 está ligado a 2019).

CSP – *Circum sporozoite protein* (Proteína Circum esporozoíta)

DARC – *Duffy antigen/chemokine for receptor* (Antígeno do grupo sanguíneo *Duffy* receptor para quimiocinas)

DBL – *Duffy binding like* (Dominio de Ligação *Duffy*)

DBP – *Duffy Binding Protein*(Proteína de ligação *Duffy*)

DBPII – *Duffy Binding Protein*(Proteína de ligação *Duffy* – região II)

DEKnull2 - Proteína DBPII mutada com domínio variável (DEK) ausente, segunda geração

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DO – Densidade Ótica

EA-d-p47/54-biotina - *Early Antigen diffuse* (antígeno precoce)

eBL– *Endemic Burkitt Lymphoma*(Linfoma de Burkitt Endêmico)

EBNA – *Epstein-Barr Nuclear Antigen* (ntígeno nuclear de Epstein – Barr)

EBP – *Erythrocyte binding protein*(Proteína de ligação no eritrócito)

EBV – Epstein-Barr vírus 6

EDTA – *Ethylene diamine Tetraacetic Acid* (Ácido Etileno diamino Tetra-Acético)

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

GP350 – Glicoproteína 350

HBV - *Hepatitis B Virus* (Vírus da Hepatite B)

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

IL-10 – Interleucina 10

IgM – Imunoglobulina M

IgG – Imunoglobulina G

IR – Índice de Reatividade

LB – Linfoma de Burkitt

Neg VDNA – *Negative viral DNA* (DNA viral negativo)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – *Polimerease Chain Reaction*(Reação em cadeia da polimerase)

Pers VDNA – *Persistent viral DNA* (DNA viral persistente)

PNCM – Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária

PvDBPII– *Plasmodium vivax Duffy Binding Protein* (Proteína de ligação Duffy de *Plasmodium vivax*)

PvMSP1-19– *Plasmodium vivax merozoite surface protein* (Proteína de superfície do merozoíto de *Plasmodium vivax* – porção 19)

PvAMA1 - *Plasmodium vivax apical membrane antigen 1* (Antígeno 1 de Membrana Apical de *Plasmodium vivax*)

qPCR – *quantitative Polimerease Chain Reaction* (Reação em cadeia quantitativa da polimerase)

Sal-1 – Salvador 1 (Cepa referência da proteína DBPII de *Plasmodium vivax*)

VCAp-18 - *Viral Capside Antigen p-18* (antígeno do capsídeo viral p-18)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Aspectos gerais da malária humana	15
1.1.1 Panorama mundial da malária	15
1.1.2 Malária no Brasil	17
1.1.3 Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> ssp. em humanos	21
1.2 Imunidade naturalmente adquirida contra malária	22
1.2.1 Antígenos candidatos a vacina contra as formas sanguíneas do <i>Plasmodium vivax</i>	24
1.2.1.1 Duffy Binding Protein (DBP): principal antígeno candidato a vacina contra as formas sanguíneas do <i>P. vivax</i>	25
1.2.1.2 Protótipo vacinal baseado na DBPII: DEKnull-2	27
1.2.1.3 Proteína de Superfície do Merozoíto-1 (MSP-1)	29
1.2.1.4 Antígeno Apical de Membrana-1 (AMA-1)	32
1.3 Coinfecções frequentemente associadas à malária	34
1.3.1 Epstein-Barr vírus (EBV) e malária	36
1.4 Epstein-Barr vírus	38
1.4.1 Ciclo de vida do Epstein-Barr vírus	39
1.4.2 Cinética de anticorpos na infecção pelo EBV	42
2 JUSTIFICATIVA	45
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos específicos	47
4 DESENHO METODOLÓGICO E ABORDAGEM EXPERIMENTAL	48
4.1 População e área de estudo	49
4.1.1 Obtenção das amostras de DNA e plasma	53
4.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG contra proteínas recombinantes do <i>Plasmodium vivax</i>	54
4.2.1 Antígenos recombinantes usados no teste de ELISA (PvDBPII, PvDEKnull2, PvMSP1-19,PvAMA1)	54
4.3 <i>Real-Time</i> PCR (qPCR) para detecção do vírus Epstein-Barr	55

4.3.1 Amostra controle para Epstein-Barr vírus	55
4.3.2 Protocolo de qPCR para identificação do DNA viral	55
4.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgM e IgG contra peptídeos de Epstein-Barr vírus	56
4.4.1 Peptídeos sintéticos usados nos ensaios de ELISA	56
4.4.2 Obtenção das amostras controle para o ensaio de ELISA de Epstein Barr vírus	57
4.4.3 Padronização do ensaio de ELISA	57
4.5 <i>Droplet Digital</i> PCR (ddPCR) para quantificação do DNA de Epstein-barr vírus	58
4.5.1 Amostras controle	59
4.5.2 Padronização do protocolo de ddPCR	59
4.6 Análise de dados	60
5 RESULTADOS	61
5.1 Características dos grupos expostos à malária por <i>P. vivax</i>	61
5.2 Perfil sorológico de EBV nos grupos expostos à malária por <i>P.vivax</i>	63
5.3 Perfil de reposta de anticorpos específicos contra antígenos de <i>P. vivax</i> em indivíduos com DNA viral persistente	67
5.4 Número de cópias de EBV-DNA versus níveis de anticorpos	71
6 DISCUSSÃO	75
6.1 Detecção do DNA viral circulante nos indivíduos dos grupos expostos ao <i>P.</i> <i>vivax</i>	76
6.2 Avaliação do painel de anticorpos de Epstein-Barr vírus	77
6.3 Influência do EBV-DNA na resposta de anticorpos contra proteínas de <i>P. vivax</i>	79
6.4 Associação entre os níveis de DNA viral no sangue circulante e resposta de <i>P. vivax</i>	81
7 CONCLUSÃO	83
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
APÊNDICE I: Artigo Publicado.....	104

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da malária humana

1.1.1 Panorama mundial da malária

Caracterizada como uma doença infecciosa febril aguda, a malária tem uma distribuição mundial, e é uma das principais causas de mortalidade e morbidade em crianças abaixo de 5 anos, gestantes e pessoas não imunes. De acordo com a Organização A distribuição de casos da doença depende de fatores ambientais, econômicos, sociais e políticos que afetam, países tropicais e subtropicais, em regiões de baixa renda e, desta forma, a malária continua sendo considerada um problema de saúde pública (WHO, 2021).

Atualmente, cinco espécies são responsáveis pela quase totalidade dos casos de malária humana, - *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e o *P. knowlesi*, sendo este último parasito de primatas não-humanos, que recentemente têm causado infecções graves em humanos, principalmente no sudeste asiático e no continente africano (COX-SINGH *et al*, 2008; ONG *et al*, 2009).

Entre as espécies causadoras de malária em humanos, o *P. falciparum* ainda é responsável pela maioria dos casos e mortes, principalmente na região da África, onde foi responsável por 97% dos casos em 2019 (WHO, 2020). Já, o *P. vivax*, por sua vez, é a espécie que possui a maior distribuição geográfica mundial, além de ser a espécie mais prevalente fora do continente africano (BATTLE *et al.*, 2019).

Em 2020, estimou-se que cerca de 241 milhões de casos de malária ocorreram globalmente nos 85 países endêmicos para a doença (Figura 1). Foram registrados 14 milhões de casos da doença a mais que em 2019, e este aumento de casos foi associado às interrupções dos serviços locais de controle de malária devido a pandemia causada pelo novo corona vírus (SARS-CoV-2), que causa a COVID-19 (WHO, 2021).

Figura 1. Países segundo status de casos autóctones em 2000



Fonte: Adaptado de WHO, 2020.

Entretanto, no início da pandemia, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou o documento “Adaptando as intervenções contra a malária na resposta à COVID-19”, onde os países deveriam buscar identificar os serviços essenciais que deverão ser priorizados, como serviços médicos, distribuição de medicamentos, urgências e emergências (WHO/GMP, 2020).

Para reforçar a importância da manutenção dos serviços essenciais de saúde, a OMS realizou ainda uma análise do impacto de vários níveis de interrupção dos serviços para malária. Desta forma, foi possível conseguir financiamento de muitos países desenvolvidos (não endêmicos) para reforçar os programas locais de países endêmicos, particularmente, no continente africano (WHO, 2021). Embora a suspensão dos serviços dos programas de controle da malária, limitou o acesso as estimativas acuradas do número de caso da doença em 2020, as análises sugerem que houve, aproximadamente, o mesmo número de casos do ano anterior, o que correspondeu a 108 países endêmicos, com predomínio do continente Africano (WHO, 2021).

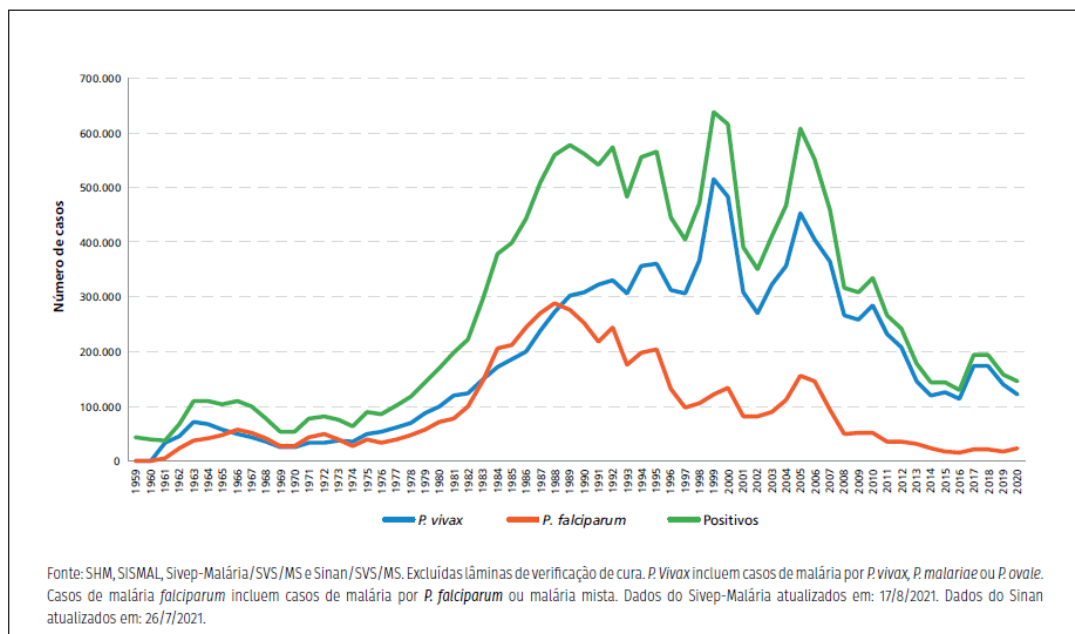
Atualmente, estima-se que as metas estabelecidas pela Estratégia Técnica Global para a Malária 2016-2030 (*Global Technical Strategy for Malaria, GTS*) para redução na incidência e mortalidade global de malária até 2030 estão longe de serem atingidas (GTS/WHO, 2020).

Neste contexto, considera-se como agravante para o não cumprimento da meta -- isto é, redução de mais de 90% da transmissão global de malária até 2030 -- os seguintes fatores (GTS/WHO, 2021): (i) conflitos sociopolíticos em regiões de transmissão, incluindo em países da América Latina e África; (ii) recursos limitados para os programas de controle e vigilância; e (iii) resistência dos plasmódios aos antimaláricos e dos mosquitos vetores aos inseticidas (PATOILLARD E *et al.*, 2017; WHO, 2017).

1.1.2 Malária no Brasil

Em um contexto nacional, entre os anos de 2014 e 2016, os casos de malária apresentaram pouca variação (FERREIRA M, *et al.*, 2016), com um aumento de mais de 50% no número de casos registrados apenas em 2017, se mantendo no ano seguinte. De acordo com dados do Ministério da Saúde, desde o ano de 2018 o número de casos de malária no país vem reduzindo, e em 2020 cerca de 145 mil casos de malária foram confirmados no país, com uma redução de 7,8% em relação ao ano anterior (SVS/MS, 2021) (Figura 2).

Figura 2. Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2020.

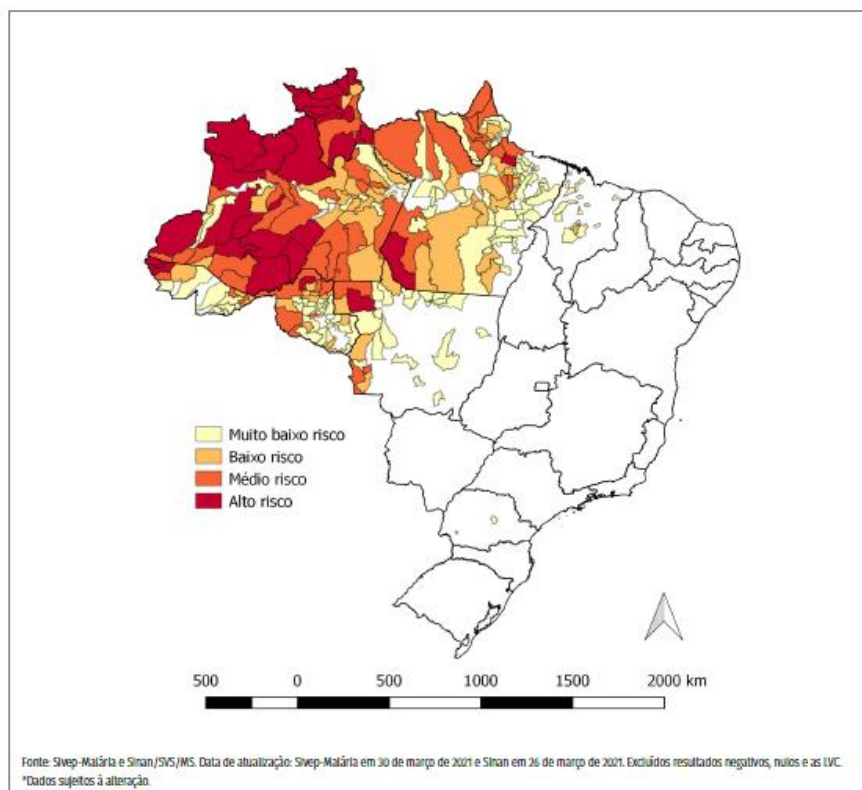


Fonte: Boletim de malária – Ministério da Saúde, 04/2021.

Foi observada também, no período de janeiro a junho de 2021, uma diminuição de 12,5% dos casos de malária notificados no país, 11,8% de casos autóctones e de 51% no total de casos importados de outros países, em relação a este mesmo período do ano anterior(SVS/MS, 2021). Esta redução do número de casos de uma forma geral, pode estar associada a intensificação dos programas de controle de malária no país como medida de resposta aos casos importados da Venezuela nos anos de 2017-2018 (WHO, 2020).

Além disso, a subnotificação de casos de malária no último ano, como reflexo da pandemia de COVID-19, favoreceu a redução dos deslocamentos dos pacientes aos serviços de saúde e dos agentes de endemia até as residências de difícil acesso para diagnóstico e notificação de casos. Em contrapartida, observou-se um crescimento da solicitação de testes rápidos de malária, e isso se deve possivelmente pela dificuldade do diagnóstico por microscopia durante a pandemia, bem como o aumento de casos suspeitos de malária (SVS/MS, 2021).

Figura 3. Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2019



Fonte: Boletim de malária – Ministério da Saúde, 04/2021.

Em grande parte, os casos de malária no país estão concentrados na região conhecida como Amazônia legal, que compreende os estados do Acre, Amapá, Amazonas (AM), Maranhão (MA), Mato Grosso (MT), Pará (PA), Rondônia (RO), Roraima (RR) e Tocantins (TO) (SNOW *et al.*, 2005) (Figura 3). Nesta região, cerca de 89% dos casos são decorrentes de infecção por *P. vivax*, contudo também circulam no país o *P. falciparum*, o *P. malariae* entre outras espécies (SVS/MS, 2021).

A ocupação intensa e desordenada das áreas peri-urbanas, o desmatamento para extração de madeira, a atividade de garimpo, de agricultura e as condições precárias de saneamento e moradia dos assentamentos, contribuem fortemente para o agravamento e a manutenção da transmissão de malária nessa região (MARQUES *et al.*, 1986; BROOKER S, 2007). Contribuindo ainda para a malária na região, estão os casos importados, originários dos países que fazem fronteira com o Brasil. O fluxo migratório entre estes países e o Brasil traz inúmeros desafios para o programa de controle da malária. No período de janeiro de 2020 a junho de 2021, o país registrou mais de 2 mil casos de malária importados de outros países (SVS/MS, 2021).

Os casos de malária fora da área endêmica, classificados como extra-amazônicos, também possuem grande importância devido ao possível diagnóstico tardio com alto índice de letalidade, desta forma a doença nestes locais não deve ser negligenciada (SVS/MS, 2021). Grande parte deles são importados dos estados amazônicos, bem como do continente africano e outros países da América do Sul (GUERRA, SNOW, & HAY, 2006). O fato de existirem poucos casos importados na região extra-amazônica, não significa que não há risco (SVS/MS, 2021).

Mesmo sendo considerada área não endêmica para malária, na região extra-amazônica existe risco elevado de transmissão autóctone da doença principalmente devido à presença de mosquitos vetores e do constante fluxo migratório de indivíduos que ocorre entre área endêmica e não endêmica (LORENZ *et al.*, 2015). Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, em 2020, mais de 90% dos casos de malária extra-amazônicos notificados no estado foram importados de áreas endêmicas no Brasil, sendo os demais casos notificados provenientes de outros países endêmicos, principalmente, do continente africano (SVS/MS, 2021).

De grande relevância, existe ainda a transmissão autóctone de malária em áreas de Mata Atlântica (BRASIL *et al.*, 2017) e nessas regiões, os primatas não humanos têm sido mencionados com reservatório da doença, já que os humanos

podem se infectar com *P. simium*, parasito frequente na região esemelhante geneticamente e morfológicamente ao *P. vivax*(DE PINA-COSTA *et al.*, 2014; DE ALVARENGA *et al.*, 2018).

Desta forma, o *P. vivax* continua sendo um grande desafio para os programas de controle e eliminação da doença no Brasil. Parte das dificuldades de controlar este parasito se deve às peculiaridades do seu ciclo biológico, incluindo (i) presença de formas latentes no fígado, que são responsáveis por casos de recaídas da doença; (ii) produção precoce de gametócitos, que torna a infecção de mosquitos vetores mais eficiente e, (iii) invasão apenas de reticulócitos jovens, levando a baixas parasitemias difíceis de serem detectadas no diagnóstico de rotina (CHENG *et al.*, 2015; ADAMS & MUELLER, 2017; BOURGARD, *Cet al.*, 2018; DE JONG, R *Met al.*, 2019). Assim, os métodos tradicionais de controle, baseados em diagnóstico precoce e tratamento oportuno, têm pouco impacto no controle desta espécie (DA SILVA-NUNES *et al.*, 2012; FERREIRA; CASTRO, 2016, 2019).

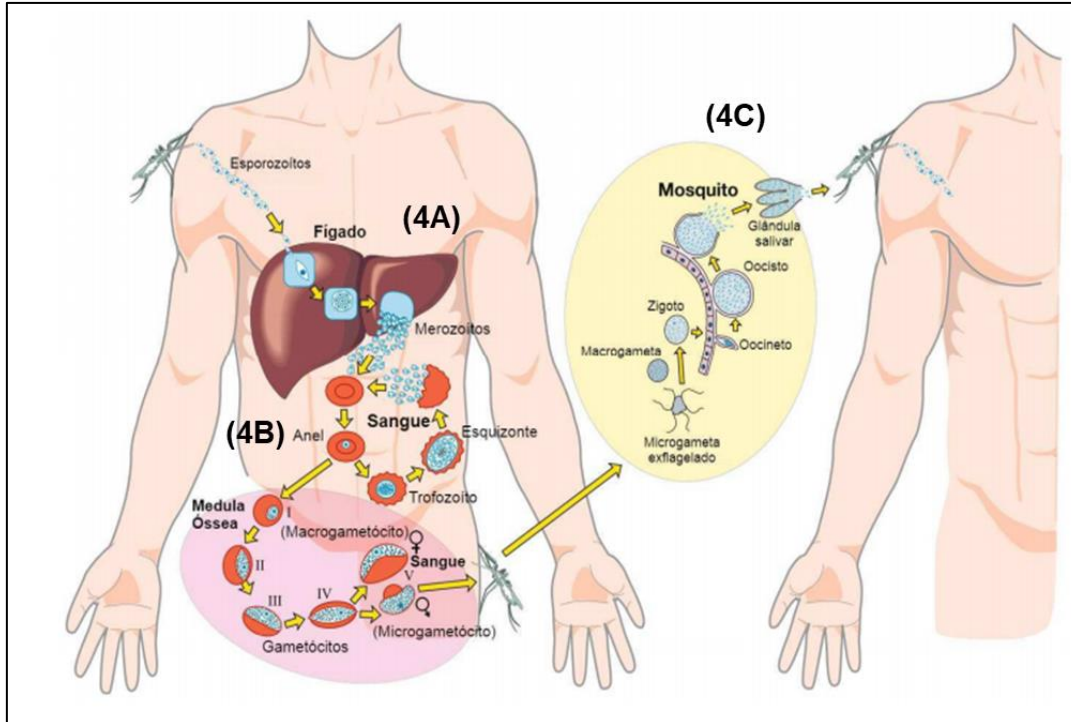
De fato, o tratamento precoce, antes que os gametócitos apareçam na circulação, demonstrou considerável impacto na transmissão de *P. falciparum*. Já o tratamento precoce contra *P. vivax* não apresentou muita eficácia, uma vez que os gametócitos se mantêm circulantes no sangue cerca de três dias após o início do ciclo eritrocítico (revisto por OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). Além disso, as infecções decorrentes da presença de *P. vivax* transcorrem, na maioria das vezes, em infecções preferencialmente benignas e muitas vezes assintomáticas, favorecendo a subnotificação desta espécie (FERREIRA; CASTRO, 2016). Essas razões evidenciam porque a pesquisa em *P. vivax* deve ser considerada prioridade não só no Brasil, mas no mundo (SIQUEIRA, AM *et al.*, 2016).

1.1.3 Ciclo biológico de *Plasmodium* ssp. em humanos

Os plasmódios possuem um ciclo heteroxênico, devendo obrigatoriamente, possuir um hospedeiro vertebrado (homem), onde acontece a fase assexuada, e um invertebrado (mosquito), responsável pela fase sexuada do ciclo (MUELLER *et al.*, 2013). Ao realizar o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito anofelino inocula as formas infectantes (esporozoítos) na derme do hospedeiro vertebrado. Os parasitos

migram da pele do indivíduo através de duas vias: pela corrente linfática (onde não sobrevivem), ou por meio da corrente sanguínea, por onde são levados até o fígado, atravessam os hepatócitos, até estabelecem a infecção (TAVARES et al., 2013).

Figura 4. Representação esquemática do ciclo do Plasmodium no hospedeiro vertebrado humano



Fonte: Adaptado de Karunajeewa & Mueller, 2016.

O ciclo hepático ou exo-eritrocítico (Figura 4A) tem duração em média de duas semanas e é assintomático. Nessa etapa, os esporozoítos se desenvolvem em esquizontes teciduais e posteriormente em merozoítos, que são liberados para a corrente sanguínea através de vesículas chamadas merossomos (GREENWOOD et al., 2008). As espécies *P. vivax* e *P. ovale* desenvolvem uma forma chamada hipnozoíto, que permanece latente no fígado por longos períodos e, quando reativadas, levam o indivíduo a recaídas de malária, desenvolvendo um novo episódio sem haver uma reinfecção pela picada do mosquito (ADAMS&MUELLER, 2017).

Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos e dão início ao chamado ciclo sanguíneo, ou eritrocítico (Figura 4B). No interior das hemácias, o parasito se desenvolve por esquizogonia nas formas de trofozoíto jovem (anel), trofozoíto maduro e esquizonte sanguíneo até que a hemácia se rompa

e o ciclo se reinicie com a invasão de novos eritrócitos. Essa ruptura é responsável pelos sintomas clínicos característicos da doença (MOHANDAS; AN, 2013). Durante o ciclo eritrocítico, alguns merozoítos se diferenciam nas formas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos. Essas formas são infectantes para o mosquito anofelino que as ingere junto com o sangue em um novo repasto sanguíneo. O aparecimento dos gametócitos no sangue periférico acontece em tempos distintos nas diferentes espécies do parasito. No *P. falciparum* os gametócitos aparecem apenas após oito a dez dias de ciclo sanguíneo, enquanto no *P. Vivax* esse aparecimento acontece com três dias (GILLES; WARRELL, 1985).

O ciclo no mosquito (Figura 4C) inicia com a exflagelação do microgametócito formando oito microgametas e a diferenciação do gametócito feminino em macrogameta (GUTTERY et al., 2012; MEIS et al., 1992). O zigoto formado pela fusão dos gametas masculino e feminino se desenvolve em oocineto, o qual atravessa a membrana do intestino e o agora chamado oocisto se aloja entre o intestino médio e a lâmina basal, onde se rompem e liberam os esporozoítos, que serão posteriormente inoculados no hospedeiro vertebrado em um novo repasto sanguíneo, continuando o ciclo.

1.2. imunidade naturalmente adquirida contra a malária

Indivíduos sem contato prévio com os parasitos da malária tendem a desenvolver uma doença febril aguda. No entanto, fatores relacionados ao hospedeiro e ao parasito podem influenciar na evolução clínica da doença, podendo levar a casos assintomáticos bem como sintomáticos com evolução para o óbito (revisto por LANGHORNE et al., 2008). De grande importância na prevenção de casos graves é o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente, incluindo humoral (COHEN; MCGREGOR; CARRINGTON, 1961) celular (WIPASA et al., 2010; NDUNGU et al., 2013).

Condições genéticas e idade do hospedeiro, espécie e variabilidade do parasito, exposição previa à malária, bem como o nível de transmissão sob o qual os indivíduos estão ou foram expostos, são fatores que podem influenciar na qualidade da imunidade adquirida contra malária expostos (FOWKES; BOEUF; BEESON, 2016; MUELLER et al., 2013; NOGARO et al., 2011).

Estudos demonstraram que a imunidade naturalmente adquirida contra a doença se desenvolve de forma lenta e gradativa após sucessivas infecções (LANGHORNE *et al.*, 2008; ASHLEY EA *et al.*, 2018). Em áreas hiperendêmicas para a doença, como na África, crianças menores de cinco anos são altamente susceptíveis à doença grave. Entretanto, com o passar dos anos, os indivíduos tendem a desenvolver uma proteção clínica contra os sintomas graves da doença, sendo que a imunidade estéril é raramente alcançada (MARSH e KINYANJUI, 2006; WEISS *et al.*, 2010; ASHLEY EA *et al.*, 2018; ANTONELLI *et al.*, 2019). Nestas áreas, indivíduos adultos desenvolvem uma imunidade eficiente contra os parasitos, considerados assim semi-ímmunes, apresentando baixos níveis de parasitemia detectadas, em geral, pelas técnicas moleculares mais sensíveis (BOUSEMA T. *et al.*, 2014).

Já está bem demonstrado que esta imunidade naturalmente adquirida é dependente da exposição contínua ao parasito, pois na ausência desta exposição o indivíduo tende a perder a imunidade clínica adquirida (LANGHORNE *et al.*, 2008; GHANI *et al.*, 2009; CROMPTON *et al.*, 2010). Em áreas de transmissão instável, esporádica, indivíduos de todas as faixas etárias estão potencialmente sujeitos à malária clínica (FOWKES *et al.*, 2016). Neste quadro de ausência de exposição contínua ao parasito, o desenvolvimento da imunidade duradoura contra a malária parece ser deficiente, uma vez que, os indivíduos expostos tendem a desenvolver uma resposta de anticorpos protetores de vida curta. Assim, a exposição contínua aos antígenos do parasito parece ser necessária não só para a geração de anticorpos protetores, mas também para a persistência de subpopulações de células B e T de vida longa (NJAU e JACOB, 2012; ANTONELLI LR, *et al.*, 2019).

Sabe-se que na malária, os anticorpos produzidos são direcionados principalmente contra regiões polimórficas de proteínas (CHAN *et al.*, 2014) que são expostas durante a fase sanguínea do parasito. Desta forma, estes anticorpos podem contribuir com o bloqueio da invasão dos merozoítos nos eritrócitos inibindo o desenvolvimento do parasito (COHEN J *et al.*, 2011; O'DONNELL *et al.*, 2001). Além disso podem atuar em conjunto com o sistema do complemento para a lise do parasito (BOYLE *et al.*, 2015), e propiciar a fagocitose de merozoítos (CHAN; FOWKES; BEESON, 2014; HILL *et al.*, 2013). De maneira geral, os anticorpos contra as proteínas de fase sanguínea do parasito auxiliam na redução da

parasitemia e dos sintomas clínicos da doença. Entretanto, pouco se sabe sobre a aquisição e manutenção desses anticorpos na malária.

Devido a extensa diversidade genética dos parasitos, o direcionamento dos anticorpos contra essas regiões polimórficas das proteínas, pode ser utilizado pelo parasito como uma forma de escape ao sistema imune humano (SCHERF A, LOPEZ-RUBIO JJ, RIVIERE L., 2008; TAKALA SL, PLOWE CV., 2009), dificultando o estabelecimento de uma resposta imune eficiente contra a doença. Assim, alguns estudos têm sugerido que indivíduos expostos a infecções com diferentes clones do parasito, parecem adquirir anticorpos capazes de combater diferentes variantes do parasito, favorecendo o desenvolvimento de proteção clínica mais efetiva (KING et al., 2015; MURUNGI et al., 2013).

De forma interessante, tem sido demonstrado que a aquisição de uma resposta imune protetora – mediada por anticorpos e células - contra *P. falciparum* e *P. vivax* parece ocorrer de forma diferente, sendo mais precoce para o *P. vivax* (KOEPLI et al., 2013; PHIMPRAPHI et al., 2008). De fato, os trabalhos clássicos de malarioterapia em pacientes com neurosífilis sugerem que poucas picadas infectantes parecem ser suficientes para a aquisição de proteção clínica contra o *P. vivax* (revisto por Adams & Mueller, 2017).

Essa diferença no tempo necessário para aquisição de proteção clínica parece ser explicada pelas diferenças biológicas existentes entre estas duas espécies de *Plasmodium* (MUELLER et al., 2013), incluindo: (1) a formação de hipnozoítos durante o ciclo hepático do *P. vivax*, onde a reativação pode promover um *booster* na resposta imune; (2) maior força de infecção (*molecular force of blood-stage infection, FOB*) causada por parasitos geneticamente distintos ao longo do tempo, já que a infecção multiclonal é mais frequente em *P. vivax* que *P. falciparum* (KOEPLI et al., 2013; WHITE, NJ., 2011; MUELLER, I. et al., 2013; CHEN et al., 2016); e a (3) grande dependência da proteína PvDBP para a invasão dos eritrócitos (ADAMS et al., 1992), o que pode contribuir para uma resposta de anticorpos bloqueadores ao *P. vivax* mais eficiente.

1.2.1. Antígenos candidatos a vacina contra as formas sanguíneas do *Plasmodium vivax*

Do ponto de vista de desenvolvimento de vacinas, os avanços relacionados a uma vacina contra o *P. falciparum*, espécie mais patogênica, progrediram

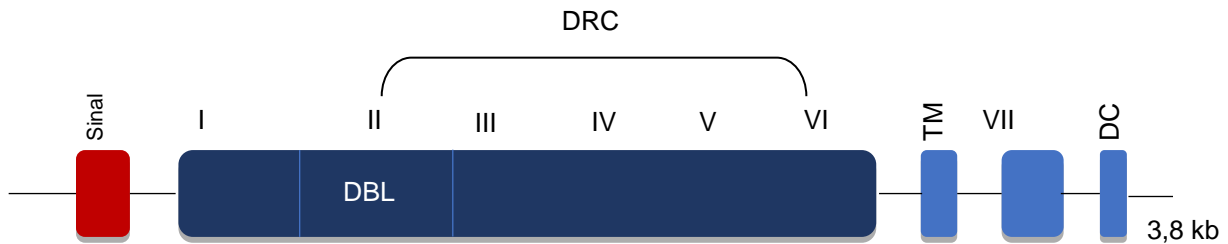
consideravelmente nos últimos anos. Como resultado, vários antígenos contra as formas pré-eritrocíticas e sanguíneas de *P. falciparum* encontram-se em ensaios clínicos (THAM, BEESON, RAYNER, 2017; DRAPER et al., 2018). Este é o caso da vacina recombinante RTS,S/AS01 que é baseada na proteína circum-sporozoita (CS) do *P. falciparum*, em associação com a proteína do envelope viral do vírus da hepatite B (HBsAg). Esta vacina já foi avaliada em ensaios de fase 3 em mais de 15.000 crianças africanas (LAURENS, 2018). Recentemente, a OMS recomendou da vacina RTS, S entre crianças na África Subsaariana e em outras regiões com transmissão de moderada a alta da malária por *P. falciparum* (OPAS., 2021). A recomendação foi baseada em resultados de um programa piloto em andamento em Gana, Quênia e Malawi que alcançou mais de 800 mil crianças desde 2019 (HOGAN AB., 2020).

Em relação ao *P. vivax*, poucos antígenos encontram-se nos estágios iniciais de ensaio clínico (BHARDWAJ et al., 2017; DE et al., 2021; SINGH et al., 2018; ARÉVALO-HERRERA et al., 2022). Isso demonstra que a pesquisa para o desenvolvimento de vacinas contra o *P. vivax* tem sido negligenciada. Neste sentido, grande parte dos estudos vacinais em *P. vivax* tem se concentrado em antígenos sanguíneos do parasito, particularmente, proteínas envolvidas na invasão dos reticulócitos passíveis de serem bloqueadas por anticorpos neutralizantes da invasão (ADAMS, JH.; MUELLER, I., 2017).

1.2.1.1 Duffy Binding Protein (DBP): principal antígeno candidato à vacina contra as formas sanguíneas do *P. vivax*

A DBP (*Duffy Binding Protein*) constitui atualmente um dos principais antígenos candidato a vacina contra as formas sanguíneas do *P. vivax* (CHOOTONG et al., 2012; SINGH et al., 2018). Esta proteína faz parte de uma família de proteínas que se ligam aos eritrócitos (DBL-EBP) (ADAMS et al., 1992; GILBERGER et al., 2003; MAYER et al., 2001). Estruturalmente a DBP é dividida em sete regiões (Figura 5). O ligante funcional da proteína encontra-se localizado na região II da DBP (DBPII) e corresponde há cerca de 300 aminoácidos, sendo seu sítio de ligação ao eritrócito situado em um fragmento de 170 aminoácidos que contém as cisteínas 5 a 8 (RANJAN & CHITNIS, 1999; SINGH et al., 2003).

Figura 5. Representação esquemática dos domínios estruturais da *Duffybindingprotein* de *P. vivax*. Na figura, estão representadas as sete regiões, sendo seis extracelulares (I-VI) e uma transmembrana (VII). Um domínio N-terminal rico em cisteína, o domínio de ligação DBL (região II), e um segundo domínio conservado rico em cisteína (região VI). O principal sítio de ligação para o reconhecimento do receptor é a porção central da DBP entre os aminoácidos 206 e 530 (C4 e C7), sendo esta, a porção mais polimórfica da proteína.



Fonte: Adaptado de Vanbuskirk *et al.*, 2004).

Para a maior parte dos isolados de *P.vivax*, a DBPII é essencial para a invasão dos reticulócitos, pois este ligante forma uma junção irreversível com o receptor Duffy/DARC presente na superfície destas células hospedeira (ADAMS&MUELLER, 2017). Em condições naturais, a DBPII induz anticorpos inibitórios (BIABs – *Binding Inhibitory Antibodies*), isto é, capazes de bloquear a interação ligante (DBPII) – receptor (DARC) (MICHON; FRASER; ADAMS, 2000). Estudos recentes têm mostrados que estes anticorpos induzem proteção contra a doença clínica em áreas endêmicas (HE *et al.*, 2019; KING *et al.*, 2008), incluindo a Amazônia brasileira (NICOLETE *et al.*, 2016).

Diante da importância da resposta de anticorpos inibitórios da interação ligante-receptor, faz-se necessário avaliar anticorpos anti-DBPII não apenas pela sorologia convencional (ELISA-*enzyme-linked immunosorbent assay*), mas também através de ensaios *in vitro* que possam ser indicativos de anticorpos inibitórios (BIABs) contra o ligante (DBPII). Entretanto, a complexidade dos ensaios *in vitro* tem feito com que poucos grupos de pesquisa utilizem estas metodologias, como é o caso do nosso grupo de pesquisa (CERAVOLO *et al.*, 2008; KANO *et al.*, 2016; SOUZA-SILVA *et al.*, 2014).

Na Amazônia brasileira, nosso grupo de pesquisa em malária (BMIM, IRR/Fiocruz) tem conduzido importantes trabalhos a fim de caracterizar o potencial da DBPII como candidato a vacina (revisto por DE SOUSA *et al.*, 2014). O grupo

demonstrou que essa proteína é naturalmente imunogênica, e que essa resposta aumenta em função do tempo de exposição (CERAVOLO et al., 2010; CERÁVOLO et al., 2005). Além disso, em um estudo longitudinal conduzido na Amazônia, foi possível demonstrar que uma pequena parcela de indivíduos naturalmente expostos é capaz de desenvolver uma resposta de anticorpos inibitórios da interação DBPII-DARC (SOUZA-SILVA et al., 2014), corroborando achados anteriormente publicados por outros grupos de pesquisa (CHOOTONG et al., 2012; KING et al., 2008). Entretanto, embora poucos indivíduos desenvolvam uma resposta de anticorpos inibitórios, uma vez adquirida, esta resposta se mantém estável por um longo período (SOUZA-SILVA et al., 2014).

A razão pelo qual apenas uma pequena parcela de indivíduos seja capaz de desenvolver uma resposta inibitória ainda não é completamente conhecida, mas pode ser parcialmente explicada pelo polimorfismo genético na região do ligante (SOUSA et al., 2006, 2010) e susceptibilidade mediada pelo HLA-Classe II (KANO et al., 2016).

Análises prévias das variantes de DBPII em amostras de campo já haviam demonstrado que esta região é hipervariável se comparada a outras regiões da proteína (TSUBOI et al., 1994). Os polimorfismos ocorrem frequentemente em certos resíduos em um padrão consistente com uma pressão seletiva na DBP, sugerindo que essa variação alélica seja um mecanismo de evasão imune (KHO et al., 2001; TSUBOI et al., 1994; VANBUSKIRK et al., 2004).

A diversidade no domínio do ligante dessa proteína representa um potencial problema que pode comprometer a eficácia de uma vacina, uma vez que esses polimorfismos presentes no ligante fazem com que a resposta ao *P. vivax* seja cepa-específica (CERAVOLO et al., 2009; VANBUSKIRK et al., 2004). Assim, espera-se que vacinas baseadas na DBPII possam superar essa limitação de especificidade de resposta. Para tal, protótipos vacinais baseados em epítomos conservados da DBPII tem sido desenvolvidos (NTUMNGIA; ADAMS, 2012).

1.2.1.2 Protótipo vacinal baseado na DBPII: DEKnull-2

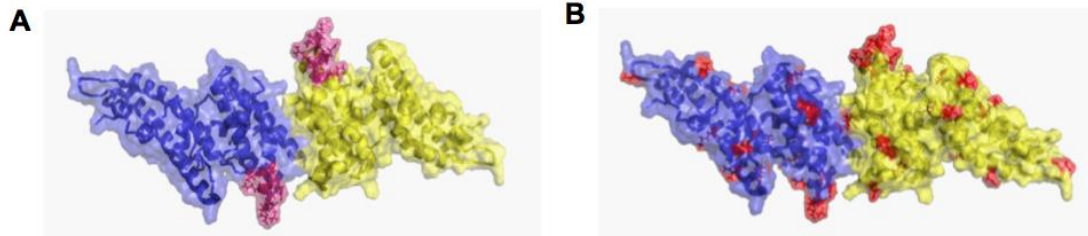
Em um estudo conduzido na Papua Nova Guiné por Chootong e colaboradores (2010) foi identificado um epítomo imunodominante e altamente polimórfico na região do ligante da DBP (DBPII). Esse epítomo - denominado DEK – é exposto à superfície

adjacente ao domínio de ligação DARC, e parece não ser funcionalmente importante para a ligação aos eritrócitos (BATCHELOR; ZAHM; TOLIA, 2011; VANBUSKIRK et al., 2004) . Com isso, protótipos vacinais têm sido desenvolvidos em uma tentativa de direcionar a resposta imune para outros sítios não polimórficos (NTUMNGIA; ADAMS, 2012).

Com o objetivo de contornar a limitação de resposta de anticorpos anti-DBPII cepa específica, o grupo de pesquisa do nosso colaborador (JH Adams, South Florida University, Tampa, FL, EUA) tem desenvolvido variantes sintéticas de DBPII onde o epítipo polimórfico DEK foi eliminado por mutação site-específica , denominada família DEKnull(NTUMNGIA et al., 2015, 2017; NTUMNGIA; ADAMS, 2012). Neste sentido, dois protótipos vacinais se mostram mais promissores em animais de experimentação, DEKnull (Figura 6A) e DEKnull-2 (Figura 6B). Enquanto a DEKnull possui como característica a ausência de resíduos polimórficos e polares que estão presentes no epítipo DEK (DEKAQQRRK), a DEKnull-2 foi construída para eliminar a maioria dos resíduos polimorfismos imunogênicos não-funcionais (isto é, que não são essenciais para a invasão). Embora ambas as construções tenham sido imunogênicas em animais de laboratório (camundongos e coelhos), a DEKnull-2 se mostrou mais promissora induzindo elevados níveis de anticorpos contra diferentes variantes da DBPII, incluindo aqueles capazes de bloquear a interação ligante (DBPII) receptor (DARC) (NTUMNGIA et al., 2017).

No Brasil, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que indivíduos naturalmente expostos a malária vivax apresentam uma elevada e estável resposta de anticorpos IgG contra esse protótipo, quando comparado a cepa referência de DBPII Sal-1 e a variante Brz-1, que é a mais frequente na Amazônia brasileira (NTUMNGIA et al., 2017; PIRES et al., 2018). Assim, esta proteína tem potencial para ser utilizada em métodos que visem identificar proteção clínica, isto é, anticorpos direcionados contra epítipos conservados da DBPII que são alvos de imunidade protetora (CHEN et al., 2016; NICOLETE et al., 2016; NTUMNGIA et al., 2017).

Figura 6. Representação esquemática dos protótipos vacinais da família DEKnull. As estruturas estão representadas na forma dimérica, sendo cada monômero representado por uma cor (amarelo e roxo). A) DEKnull, sendo a localização original do epítipo DEK (DEKAQQRRK) ilustrada em rosa, e B) DEKnull-2 ilustrando em vermelho a localização dos principais epítipos polimórficos modificados



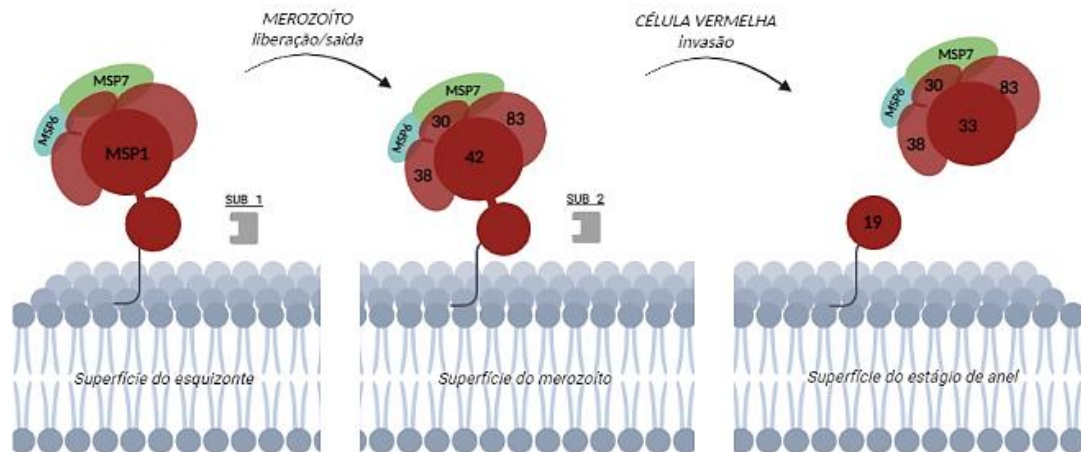
Fonte: NTUMNGIA et al., 2017

1.2.1.3 Proteína de superfície do Merozoíto (MSP-1)

Estudos realizados para caracterizar a estrutura da superfície do merozoíto mostraram que o parasito nesta fase, é coberto por proteínas integrais de membrana e periféricas chamadas MSPs (*Merozoite Surface Proteins -MSPs*), que são responsáveis por mediar as interações iniciais e reversíveis entre o parasito e a célula sanguínea (KADEKOPPALA; HOLDER, 2010; KOUSSIS et al., 2009). Desta família de proteínas, a proteína de superfície do merozoito-1 (*Merozoite Surface Protein 1 -MSP1*) é a mais abundante.

Nos parasitos da malária, essa proteína é sintetizada como uma proteína precursora de aproximadamente 200kDa que é ancorada a superfície do parasito através de uma ancora C-terminal, sendo processada em quatro fragmentos antes da ruptura das células sanguíneas contendo os merozoítos (BLACKMAN et al., 1990a). Um desses fragmentos é o C-terminal MSP1₄₂, que sofre uma clivagem durante a invasão do merozoíto nas células sanguíneas, formando MSP1₃₃ e MSP1₁₉. Ao final, MSP1₃₃ é liberado na circulação sanguínea, e MSP1₁₉ é o único fragmento que permanece ancorado na superfície do merozoíto (BLACKMAN et al., 1990b; FREEMAN; HOLDER, 1983) (Figura 7).

Figura 7. Representação esquemática do processo de montagem e processamento do complexo MSP1. A proteína MSP1 é sintetizada e associada com outras proteínas que incluem, MSP6 e MSP7. Esse complexo é expresso na superfície do esquizonte em desenvolvimento e ancorado na membrana por uma ancora de GPI. Antes da liberação do merozoíto esse complexo sofre uma clivagem inicial mediada pela protease SUB1. Alguns produtos dessa primeira clivagem permanecem associados à membrana do merozoíto, e quando o merozoíto invade uma célula vermelha, uma nova clivagem mediada pela protease SUB2 acontece. Nesse momento, SUB2 cliva o fragmento MSP1 de 42kDa ancorado na membrana em outros dois fragmentos de 33 e 19 kDa. Posteriormente o complexo é liberado, e apenas o fragmento de 19k Da permanece ancorado à membrana



Fonte: Adaptado de Holder AA., 2009

Cheng e colaboradores (2013) mostraram a capacidade de adesão da proteína MSP1-19 à eritrócitos humanos, evidenciando o potencial que esse antígeno tem de ser essencial no processo de invasão. Além disso, anticorpos de indivíduos naturalmente expostos ao *P. vivax*, e soros obtidos com a imunização de camundongos com MSP1-19 foram capazes de inibir a interação *in vitro* entre MSP1-19 e eritrócitos (CHENG et al., 2013). Em um estudo de imunização de macacos Saimiri, os autores demonstraram proteção parcial contra infecção com *P. vivax* após esquema de imunização com MSP1-19 (YANG et al., 1999). Mais recentemente, a importância da MSP1-19 foi reforçada por Dobrescu e colaboradores (2020) que demonstraram proteção contra malária grave, controle de parasitemia e balanço inflamatório em camundongos imunizados com MSP1-19 e desafiados com *P. berghei* (DOBRESCU et al., 2020). Esses dados corroboram com trabalhos anteriormente publicados que revelaram uma forte imunogenicidade de MSP1-19 em camundongos imunizados (BARGIERI et al., 2007, 2008; PARWEEN; GUPTA;

CHAUHAN, 2011), e ressaltam a relevância desse antígeno como candidato à vacina.

Uma característica importante da MSP1-19 é ser altamente conservado entre as espécies de *Plasmodium* (COOPER, 1993; DEL PORTILLO et al., 1991; SOARES et al., 1999b). Mas apesar de, a sequência gênica dos antígenos de MSP1-19 ser exclusiva para cada espécie de *Plasmodium*, um certo grau de homologia entre elas é observado (DAWSON et al., 2010), mesmo assim, estudos imunoepidemiológicos em áreas de baixa endemicidade, como o realizado na Somália por Bousema e colaboradores, não observaram uma correlação entre a resposta de anticorpos anti-MSP1-19 de *P. falciparum* e *P. vivax* (BOUSEMA et al., 2010). No Cambódia, Priest e colaboradores demonstraram que 79% das mulheres positivas para a resposta de anticorpos contra malária, apresentavam uma resposta de anticorpos anti-MSP1-19 apenas para uma espécie de *Plasmodium* (PRIEST et al., 2016). Com o objetivo de caracterizar a especificidade da resposta de anticorpos anti-MSP1-19 em áreas de alta endemicidade, Priest e colaboradores (2018) conduziram um estudo com amostras de Moçambique. Através de ensaio sorológico multiplex pela citometria de fluxo utilizando o antígeno MSP1-19 de *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*, os autores demonstraram que a resposta de anticorpos anti-MSP1-19 foi espécie específica, e que reatividade cruzada com outros plasmódios co-circulando na área ocorreu raramente (PRIEST et al., 2018). Esses dados corroboram com os anteriormente publicados por Amanfo e colaboradores, que demonstraram através de um estudo imunológico no Zimbábue que a resposta de anticorpos IgG contra MSP1-19 é espécie específico (AMANFO et al., 2016).

O potencial imunogênico da MSP1-19 já está bem caracterizado, e indivíduos residentes em áreas endêmicas de malária apresentam elevada resposta de anticorpos contra esse antígeno (RODRIGUES et al., 2003; SOARES et al., 1997; SOUZA et al., 1999). Trabalhos realizados no Brasil, Turquia e Papua Nova Guiné demonstraram que indivíduos positivos para a resposta de anticorpos anti-MSP1-19 tinham uma maior chance de estarem infectados por *P. vivax* quando comparado aos indivíduos não-respondedores (FERNANDEZ-BECERRA et al., 2010; KANO et al., 2012; LIMA-JUNIOR et al., 2012). Além disso, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que existe uma forte relação entre o número de episódios prévios de malária, e a resposta de anticorpos anti-MSP1-19 de *P. vivax* (KANO et al., 2012). Outros trabalhos, como os realizados na Indonésia, e Cambódia utilizaram os dados

sorológicos para determinar os índices de soroconversão e monitorar o padrão de transmissão local (FERREIRA; CASTRO, 2019; SURENDRA et al., 2019).

Em um trabalho recém-publicado, que teve como objetivo identificar possíveis portadores de hipnozoítos com base na resposta de anticorpos, Longley e colaboradores (2020) demonstraram que indivíduos classificados como positivos contra um painel de antígenos o qual MSP1-19 estava incluído, tinham uma maior chance de desenvolver infecção por *P. vivax* dentro de 12 meses. Estes autores confirmaram que a estratégia de resposta sorológica pode ser importante não só para identificar indivíduos infectados, mas também prováveis portadores de hipnozoítos que seriam responsáveis pela manutenção na transmissão (LONGLEY et al., 2020). Juntos, esses dados colaboram para entender a dinâmica de transmissão, identificar população com maior risco de infecção, focos de transmissão, e consequentemente, direcionar as medidas de controle e eliminação.

1.2.1.4 Antígeno Apical de Membrana-1(AMA-1)

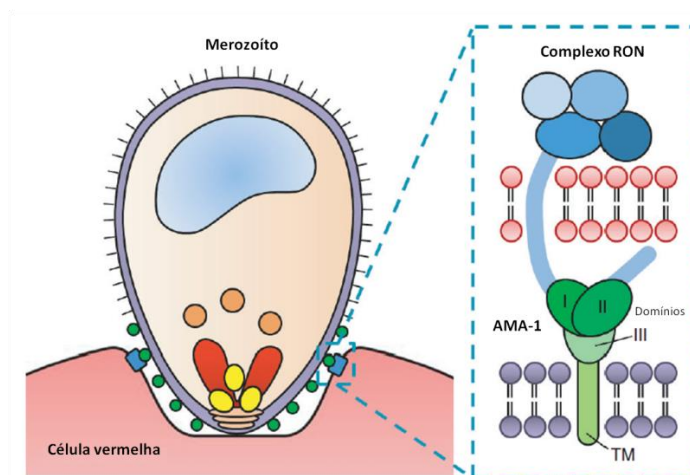
O antígeno de membrana apical 1 (*Apical Membrane Antigen-1, AMA-1*) é um antígeno de estágios assexuados do parasito, que é sintetizado e localizado no complexo apical de esporozoítos e merozoítos e está presente em todas as espécies de *Plasmodium*(DUTTA et al., 2003; SILVIE et al., 2004).

É uma proteína integral de membrana tipo I, e é estruturalmente dividida em três regiões (I, II e III) (HODDER et al., 1996). AMA-1 é essencial para a invasão do merozoíto (HEALER et al., 2002; TRIGLIA et al., 2000), e os domínios I e II são funcionalmente críticos. Ambos os domínios são reconhecidos por anticorpos inibitórios *in vitro*, e, além disso, possuem *clusters* de polimorfismo que indicam que são alvos da resposta de anticorpos (KOCKEN et al., 2000; MÚFALO et al., 2008; NAIR et al., 2002). Durante a invasão AMA-1 é liberada pelos micronemas e exerce uma função essencial para formação da junção de movimento, que é usada pelo *Plasmodium* para mediar a invasão na célula vermelha (LIM et al., 2013; TRIGLIA et al., 2000) (Figura 8).

Assim como MSP1-19, AMA-1 é capaz de induzir uma elevada resposta de anticorpos durante a infecção por *P. vivax*(MOTEVALLI HAGHI et al., 2012).

Indivíduos naturalmente expostos à malária são capazes de desenvolver uma forte resposta de anticorpos anti-AMA-1 (MÚFALO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2003; SALAVATIFAR et al., 2015), e diferentes trabalhos conduzidos no Brasil (MORAIS et al., 2006; MÚFALO et al., 2008; PIRES et al., 2018), Índia (SETH et al., 2010) e Sri Lanka (WICKRAMARACHCHI et al., 2006) demonstraram que essa resposta é desenvolvida mesmo em indivíduos com exposição limitada a malária.

Figura 8. Representação esquemática da interação entre AMA-1 (verde) e o complexo RON (azul). Durante a invasão o complexo RON é inserido na membrana da célula vermelha (vermelho) e a proteína AMA-1 na membrana do merozoíto (roxo). Os domínios II e III estão diretamente envolvidos na interação com o complexo RON para formação da junção de movimento e reorientação do merozoíto.



Fonte: Adaptado de Lim et al. 2013.

Além disso, um trabalho realizado na Turquia que incluiu a avaliação da resposta de anticorpos a inúmeros antígenos de *P. vivax*, demonstrou que a resposta de anticorpos anti-AMA-1 estava associada a uma maior chance de infecção por *P. vivax* (YILDIZ ZEYREK et al., 2011). Esses dados corroboram com os achados de Fowkes e colaboradores (2012) que demonstraram que, mulheres grávidas residentes na Tailândia que apresentavam uma resposta de anticorpos anti-AMA-1, tinham quase cinco vezes mais chance de infecção por *P. vivax* (FOWKES et al., 2012).

Esse antígeno, é até o momento, o único alvo para o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax* multi-estágio, uma vez que participa do processo de invasão

de esporozoítos (SILVIE et al., 2004) e merozoítos (LIM et al., 2013). Anticorpos naturalmente adquiridos são capazes de bloquear a interação ligante-receptor, e apesar de, a região do ligante com RON-2 ser flanqueada por uma região polimórfica que induz uma resposta cepa específica, foi identificado um epítopo associado à proteção (COLEY et al., 2007). Além disso, diversos trabalhos têm avaliado o potencial imunogênico de uma vacina recombinante baseada na região II de AMA-1 e mostraram que camundongos imunizados desenvolvem uma elevada resposta de anticorpos, incluindo anticorpos bloqueadores contra diferentes isolados de *P. vivax* (GENTIL et al., 2010; VICENTIN et al., 2014), além de resposta celular e proteção clínica (BOUILLET et al., 2011; LIMA et al., 2020). Em conjunto, esses dados demonstram o quão promissor é esse antígeno para o desenvolvimento de uma vacina.

1.3 Coinfecções frequentemente associadas à malária

A exposição frequente a múltiplos patógenos ocorre de maneira abundante nas diversas populações do mundo, e vem sendo cada vez mais relatada. A maioria das pessoas poder ser infectada de forma crônica ou latente por diversos agentes, incluindo vírus, parasitos ou bactérias. Além disso, todos os indivíduos albergam microrganismos como parte da microbiota humana, e assim, quase toda nova infecção poderá favorecer algum tipo de coinfecção (KUMAR N et al., 2018; MCARDLE *et al.*, 2018).

A infecção de um indivíduo com mais de um patógeno pode ter consequências consideráveis na evolução clínica do paciente, podendo levar em muitos casos a uma patologia mais grave quando comparada a infecção com uma única espécie de patógeno (MCARDLE *et al.*, 2018; DIAZ-MUNOZ et al., 2017; SCOTTA et al., 2016; CEBEY-LOPEZ et al., 2016; ASNER AS et al., 2014), dificultando o diagnóstico e o tratamento específicos (VAUMOURIN *et al.*, 2015). Em geral, indivíduos coinfectados com mais de uma espécie de patógeno tem risco aumentado para casos graves devido a interações não bem esclarecidas entre os diferentes agentes infecciosos (KINUNG'HI *et al.*, 2014). Determinar as consequências das coinfecções através de observações das infecções naturais em humanos possui limitações, incluindo (i) a

história natural de cada infecção e fatores associados a coinfeção por si; (ii) fatores de risco associados ao hospedeiro susceptível (iii) desenvolvimento de uma resposta imune eficiente; (iv) aspectos intrínsecos de cada patógeno, tais como virulência, resistência e variabilidade genética (MCARDLE *et al.*, 2018)(KUMAR N *et al.*, 2018).

Quando em contato com o hospedeiro vertebrado, os patógenos precisam sobreviver aos mecanismos de proteção desencadeados pelo sistema imune inato e adaptativo para se estabelecerem. Alguns patógenos são capazes de evadir do sistema imune facilitando não só sua permanência, mas também a infecção por outros organismos (SUPALI, 2010). No entanto, outros agentes infecciosos podem ser eliminados e/ou controlados por uma imunidade cruzada, isto é, induzida por outra espécie com antigenicidade similar.

O ponto negativo para o hospedeiro é que a imunidade cruzada, em algumas situações específicas, pode desencadear processos autoimunes, já que células ou tecidos do hospedeiro também podem ser reconhecidos (VAUMOURIN *et al.*, 2015). Um outro ponto negativo para o hospedeiro, ocorre quando as respostas de células B e T de memória geradas contra uma infecção, acabam influenciando na quantidade e na qualidade da resposta imune à infecção secundária subsequente. Essa influência da imunidade à infecção primária em uma infecção não relacionada subsequente é conhecida como imunidade heteróloga (KUMAR N *et al.*, 2018). Desta forma, a produção de uma resposta imune eficaz para ambas as infecções poderia ficar prejudicada.

Uma característica comum das coinfeções em doenças infecto-parasitárias é que são mais prevalentes em países em desenvolvimento, particularmente, entre as populações mais pobres (HOWARD *et al.*, 2001). A falta de acesso à água limpa, às instalações de saneamento melhoradas e a higiene pessoal inadequada são fatores de risco subjacentes importantes (ASAOLU *et al.*, 2003). De fato, no caso específico da malária, estudos epidemiológicos têm mostrado que o impacto das coinfeções é maior em populações que vivem nas regiões mais pobres do globo onde outros agentes infecciosos são altamente prevalentes, incluindo diferentes tipos de helmintos, vírus e bactérias (SHANKARKUMAR *et al.*, 2011; BROOKER *et al.*, 2007).

Tratando-se de coinfeções envolvendo vírus e malária, a maioria dos estudos caracterizam mais detalhadamente infecções associadas ao *P. falciparum*.

Diferentes estudos realizados na África avaliaram a associação entre *P. falciparum* e HIV (MBALE *et al.*, 2016; TAY *et al.*, 2015; RATTANAPUNYA *et al.*, 2015; FRISCHKNECHT & FACKLER, 2016) onde foi observada uma piora do quadro clínico, podendo ou não apresentar elevadas parasitemias e baixos índices hematimétricos, sendo os quadros mais graves descritos naqueles pacientes com comprometimento de células CD4 induzido pelo HIV.

Nas comorbidades envolvendo *P. vivax*, alguns estudos ainda são controversos, podendo mostrar ou não susceptibilidade a novas infecções ou influência na evolução clínica da doença (VAUMOURIN *et al.*, 2015). Na coinfeção humana entre *P. vivax* e *Schistosoma mansoni*, por exemplo, alguns trabalhos demonstraram um aumento da morbidade da malária enquanto outros não encontraram nenhuma associação (GETIE *et al.*, 2015; MAZIGOI *et al.*, 2010). No caso de uma infecção simultânea entre o vírus da dengue e *P. vivax*, quadros de malária mais grave são frequentemente observados (MAGALHAES *et al.*, 2012). Apesar disso, uma revisão sistemática de malária grave feita na Amazônia brasileira, demonstrou que as comorbidades, agudas e crônicas, são frequentes, mas raramente associadas com morte (LACERDA *et al.*, 2012). Um estudo realizado por Cruz e colaboradores em 2019, demonstrou que pacientes enfermos que possuíam associação de hepatite viral B e malária vivax, apresentaram um perfil de biomarcadores distinto quando comparado com aqueles infectados apenas com *P. vivax*. Estes pacientes manifestaram níveis aumentados de IL-10 que estão relacionados com a persistência viral e exaustão de células T, e de CCL2 durante a fase de lesão aguda nos hepatócitos. De fato, trabalhos com foco em malária por *P. vivax* são recentes, desta forma, mais estudos envolvendo comorbidades associadas a este parasito ainda são necessários.

1.3.1 Epstein-Barr vírus e malária

A associação entre Epstein-Barr vírus (EBV) e *P. falciparum* em áreas hiperendêmicas para malária, como é o caso de grande parte do continente africano, é fortemente conhecida como sendo fator de risco para o desenvolvimento do chamado Linfoma de Burkitt endêmico (MOORMANN *et al.*, 2016); o termo endêmico foi atribuído para especificar este tipo de câncer que tem elevada

prevalência em crianças vivendo em áreas onde a malária é endêmica (MOORMANN *et al.*, 2011). Nestas áreas, observa-se que a maioria das crianças já é soropositiva para o EBV aos três anos de idade (MOORMANN *et al.*, 2005), ao passo que outras são infectadas antes mesmo dos seis meses de vida (PIRIOU *et al.*, 2012), o que as torna altamente vulneráveis a este tipo de câncer.

Sabe-se que o *Plasmodium falciparum* reativa o EBV presente nas células B de memória, *in vivo* e *in vitro* (OLWENY CL., 1984; CHATTOPADHYAY PK, *et al.*, 2013). Antígenos específicos do parasito, causam ativação policlonal das células B e, conseqüentemente, aumentam a sobrevivência das células B infectadas pelo EBV (SIMONE O, *et al.*, 2011). Os linfócitos B presentes no CG, são células que possuem uma rápida divisão e altos níveis de expressão da enzima Citidina Desaminase Induzida por Ativação (AID). A AID, é a enzima responsável por criar mutações no DNA que favorecem os processos naturais de Hipermutação Somática (SHM). O aumento excessivo da expressão de AID nos linfócitos B do CG, ocasionado pela exposição frequente à malária, favorece o surgimento de translocações acidentais entre genes durante o processo natural de mutação no DNA (gerada pela hipermutação somática e pela troca de classe). A translocação cromossômica coloca o oncogene *c-myc* (cromossomo 8) sob o controle do locus gênico do Ig (cromossomo 14), favorecendo a expressão do gene *c-myc* (MAGRATH I., 2012; ERIKSON J., *et al.*, 1983; LOMBARDI L., *et al.*, 1987).

Sabendo que o EBV permanece em latência nos linfócitos B ao longo da vida do indivíduo (MATAR *et al.*; 2015), estudos tem demonstrado que uma vez reativado, o vírus passa a atuar protegendo as células B da morte celular programa, através do mecanismo de *down-regulation* do gene p53 (apoptose). Este mecanismo é iniciado a partir do aumento da expressão do oncogene *c-myc*, permitindo que as células não sofram apoptose, garantindo a sua sobrevivência (ROBBIANI., *et al.*, 2015; RICKINSON, 2014; LOMBARDI L., *et al.*, 1987), e conseqüentemente favorecendo o desenvolvimento do câncer (REYNALD *et al.*, 2016).

O Linfoma de Burkitt é um câncer do sistema linfático, considerado de alto grau de malignidade, que ocorre nos linfócitos B produtores de anticorpos e acomete frequentemente crianças com idade entre quatro e sete anos, residentes em áreas endêmicas para a malária (MOLYNEUX *et al.*, 2012). Já é bem estabelecido que a presença do EBV associada a exposição crônica ou repetida a malária por *P.*

falciparum, aumenta o risco de desenvolvimento do Linfoma de Burkitt (BL) (MOORMANN et al., 2005).

No Brasil, o linfoma de Burkitté regionalmente distinto, com cerca de 70% dos casos ocorrendo da região norte do país. Além disso os casos da doença no país possuem uma baixa incidência de superexpressão de p53 e uma associação acima do esperado com EBV do tipo 1 (ou tipo A) em casos esporádicos (QUEIROGA EM., et al, 2008). O LB esporádico, o tipo mais frequente no país, não está associado a infecção malárica, e se caracteriza, normalmente, sob a forma de tumores abdominais (MAGRATH, 2012, MASAKHWE et al., 2016). Desta forma, os baixos níveis de endemicidade do *P. falciparum* na Amazônia, quando comparado aos níveis africanos, parecem explicar estas diferenças (DE PINA-COSTA et al., 2014, SVS/MS, 2017). Embora não existam estudos que demonstrem a associação entre Linfoma de Burkitt e *P. vivax*, não se pode descartar a possibilidade de que o EBV possa alterar o quadro clínico da malária (AKIN et al., 2013) ou possa influenciar na resposta imune parasito-específica.

1.4 Epstein-Barr vírus (EBV)

Entre os agentes virais associados a coinfeções maláricas, destaca-se o Epstein-Barr Vírus (herpesvírus humano tipo 4), um herpes vírus da família *Herpesviridae* e subfamília *Gammaherpesvirinae* (RICKINSON, A., et al, 2007). Seu genoma é composto por uma molécula de DNA linear em fita dupla com aproximadamente 172 mil pares de bases, codificando cerca de 85 genes. As diferenças entre as sequências que codificam os antígenos nucleares (EBNA) permitem a identificação de dois genótipos de EBV; Tipo 1 (ou tipo A) distribuído entre as populações asiáticas e caucasianas, e Tipo 2 (ou tipo B) distribuído na população africana (COHEN, JI., et al, 2011).

O EBV é transmitido na maioria das vezes por contato com secreções respiratórias de um indivíduo infectado e, desta forma, consegue se disseminar facilmente. Diante disso, estima-se que cerca de 90% da população mundial possui resposta sorológica positiva para o EBV (ANDREI G., et al, 2019; MASAKHWE C., et al., 2016). A ocorrência de soroconversão de EBV tem dois padrões. Evidências indicam que a infecção primária ao vírus varia de acordo com fatores

socioeconômicos como a grande concentração de pessoas em pequenos espaços e no saneamento básico precário (BOUVARD V, et al., 2009), características de países em desenvolvimento. Em países com esse padrão de vida, a infecção ocorre no início da vida, com a maioria das crianças de países positivas antes dos três anos de idade (REYNALDI A., et al., 2016). Em países desenvolvidos com altos padrões de higiene, a soroconversão EBV atinge o pico em crianças entre 2 e 4 anos e em 14 e 18 anos. Este pico aumenta com a idade, variando de 0 a 70% na infância e chegando a mais de 90% na idade adulta (TROTTIER H, et al., 2012).

Os sintomas da infecção pelo vírus dependem da idade e do estado imunológico do indivíduo. Nas crianças, a doença se manifesta através de febre e problemas respiratórios e, na maioria dos casos, é confundida com outras doenças febris. Já nos adultos, a infecção pelo EBV se manifesta através da mononucleose infecciosa, que quase sempre desencadeia nos indivíduos febre e faringite (NOWALK & GREEN, 2016). Entretanto, a maior parte dos pacientes infectados pelo EBV é assintomática, e estes indivíduos quando não tratados, contribuem intensivamente para a transmissão do vírus (SMETS F., et al, 2000).

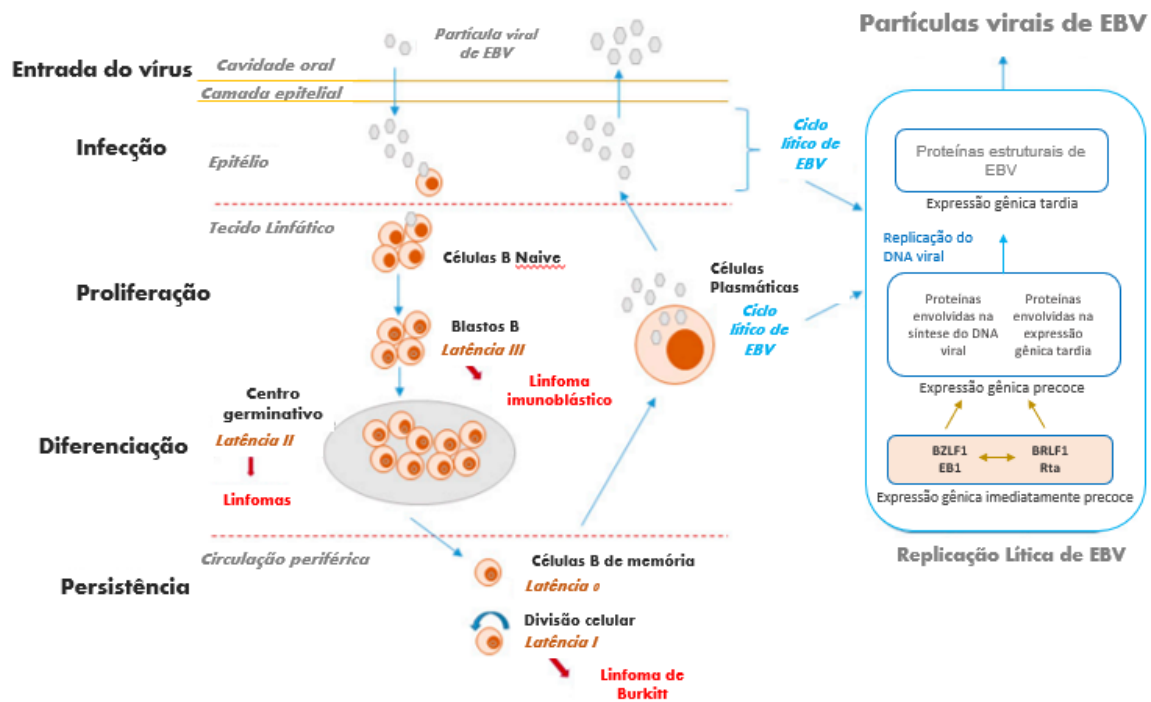
De forma contraditória, dada a natureza onipresente e assintomática da infecção, o EBV é considerado um vírus oncogênico desde a década de sessenta. Essas características incomuns são, em parte, devidas as diversas maneiras pelas quais o EBV evoluiu para exibir um controle otimizado sobre a morte celular. De fato, o EBV foi o primeiro vírus associado a uma forma incomum e agressiva de linfoma infantil (EPSTEIN M., et al, 1964), e, estima-se que pode estar associado a diversos tipos de câncer diagnosticados todos os anos (COHEN J., et al, 2011), como os Carcinomas Nasofaríngeal (NPC), os Linfomas de Células B em pacientes imunocomprometidos, a Doença de Hodgkin's, o Linfoma de Burkitt (BL), desordem linfoproliferativa pós-transplante e, ocasionalmente, pode estar associado com linfomas de Células T e câncer gástrico (CARBONE A., et al, 2009; YOUNG L, et al., 2004).

1.4.1. Ciclo de vida do Epstein-Barr vírus

As gamaherpesvíroses, como a causada pelo EBV, são linfotrópicas, isto é, possuem as células de linhagem linfóide como células-alvo que são infectadas

primeiramente e se proliferam através do ciclo lítico, mantendo-se em latência ao longo da vida do hospedeiro por meio do ciclo lisogênico (MATAR C., *et al*; 2015). Em um primeiro momento, o vírus infecta as células epiteliais, onde vão desenvolver seu ciclo lítico (Figura 9). Para entrar nestas células, a proteína viral BMRF-2 interage com as integrinas B1 celulares. Isso desencadeia a fusão do invólucro viral com a membrana da célula epitelial, permitindo a entrada do vírus (ANDREI G., *et al*, 2019).

Figura 9. Ciclo de vida do EBV, estágios de latência e linfomas derivados. O ciclo de vida viral inclui pelo menos cinco estágios diferentes (entrada do vírus, infecção, proliferação, diferenciação e persistência), e quatro deles estão associados a doenças por EBV



Fonte: Adaptado de Andrei G, et al., 2019.

Durante a infecção lítica, ocorre todo o repertório de expressão do gene viral e a progênie do vírus é produzida. Os dois principais genes líticos precoces do EBV (ou seja, BZLF1 e BRLF1) codificam transativadores que ativam promotores virais e certos promotores celulares, levando a uma cascata ordenada de expressão gênica viral: expressão gênica precoce e replicação genômica seguida de expressão gênica tardia. Os vírions produzidos durante a replicação lítica em células epiteliais permissivas permitem a disseminação de partículas virais dentro e entre hospedeiros (ANDREI G., *et al*, 2019).

Os novos vírions produzidos então, vão migrar para as células B não primadas (“naive”) que estão no epitélio da orofaringe, porta de entrada do vírus. A presença de uma glicoproteína no envelope viral (GP350), permite que o vírus invada rapidamente os linfócitos B (receptor CD21), escapando de outras células do sistema imune, incluindo linfócitos T e células Natural Killer (MURATA T., *et al*, 2014; CALATTINI S *et al.*, 2010; MILLER G., *et al*, 2007). Os linfócitos B infectados vão migrar para os linfonodos para apresentar os antígenos as células T, que vão se tornar específicas para EBV, e desta forma controlar a infecção, mantendo o vírus latente dentro das células B de memória (ANDREI G., *et al*, 2019; PIRIOU E., *et al.*, 2012).

Dentro das células B, o vírus passa por três programas de latência, e cada etapa influencia no comportamento das células B (Figura 9). Ao infectar uma célula B *naive*, o vírus entra em Latência III, onde produz proteínas e RNAs que vão ativar outras células B e conduzir a diferenciação e proliferação. Como estas células são muito imunogênicas, elas são rapidamente eliminadas pelas células T. Entretanto, o EBV é capaz de sobreviver nestas células já que mimetiza uma resposta de célula B dirigida por antígeno (ANDREI G., *et al*, 2019). Acredita-se que o vírus consiga se manter em latência na célula, por meio deste mecanismo de mimetização de resposta celular, que pode atuar como outra forma de escape do sistema imune do hospedeiro vertebrado (CALATTINI *et al.*, 2010). Durante a fase de Latência II, o EBV consegue formar pequenos centros germinativos dentro dos folículos e restringem sua expressão gênica, induzindo a célula a se diferenciar em célula B de memória.

Finalmente, os vírus passam a expressar apenas a proteína nuclear 1 (EBNA-1), permitindo que o genoma viral se divida durante a divisão do genoma celular. A entrada de células infectadas por EBV no sangue periférico resulta no desligamento de todos os genes virais que codificam proteínas; isso é chamado de latência 0 ou programa de latência onde nenhuma proteína viral é expressa. As células de memória em repouso, nas quais o vírus está quiescente, não são atacadas pelo sistema imunológico do hospedeiro e são provavelmente os locais de persistência a longo prazo (ANDREI G., *et al*, 2019).

As células B de memória ocasionalmente se dividem para manter o número estável de células e quando uma célula que carrega o vírus se divide, a proteína viral EBNA-1 é expressa para permitir que o genoma viral se replique junto com a

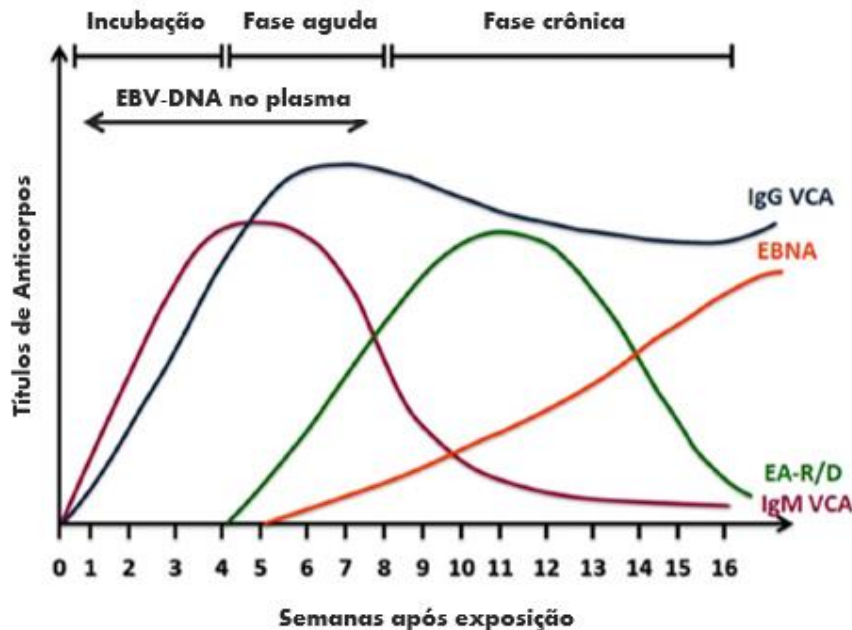
célula. As células B de memória também podem sofrer diferenciação terminal em plasmócitos e secretar anticorpos. Se tal célula contiver o vírus, o programa lítico do EBV é ativado e o vírus infeccioso liberado das células plasmáticas pode infectar células epiteliais, onde o vírus pode se replicar e ser eliminado em grandes quantidades e então ser transmitido para outros hospedeiros (ANDREI G., *et al*, 2019).

1.4.2 Cinética de anticorpos na infecção pelo EBV

O genoma do EBV codifica diferentes genes estruturais e não estruturais e, alguns desses genes são utilizados no diagnóstico sorológico, pois a resposta humoral produz anticorpos contra o produto desses genes (SMATTI MK, *et al.*, 2018). Entre os mais comumente utilizados nos testes estão os genes que codificam os antígenos do capsídeo viral (VCAs), os antígenos iniciais (EAs), bem como os genes que codificam os antígenos nucleares de Epstein-Barr (EBNAs) (KLUTTS JS, *et al.*, 2009; HESS RD., 2004).

Em indivíduos imunocompetentes, geralmente são necessários pelo menos três parâmetros sorológicos para detectar anticorpos contra EBV: VCA-IgG, VCA-IgM e EBNA-1 IgG (Figura 10) (GÄRTNER BC, *et al.*, 2003). A detecção de anticorpos IgG para EBV EA também pode ser feita e ajuda na diferenciação do status da doença por EBV (HESS RD., 2004; DE PASCHALE M, *et al.*, 2012). De forma resumida, a detecção de anticorpos VCA envolve as duas classes de imunoglobulinas IgG e IgM. A resposta de IgM ao complexo VCA é tipicamente encontrada precocemente no início dos sintomas clínicos (DUNMIRE SK, *et al.*, 2015), e é produzido de forma transitória e usado como indicador de infecção primária recente (HESS RD., 2004). Já o VCA-IgG é encontrado em infecções agudas, de convalescença ou passadas, pois começa a aparecer ao mesmo tempo que o VCA-IgM (HESS RD., 2004, DE PASCHALE M, *et al.*, 2012, HINDERER W, *et al.*, 1999). Anticorpos contra os componentes p18 persistem por toda a vida como uma indicação de exposição ao EBV (DUNMIRE SK, *et al.*, 2015).

Figura 10. Esquema de resposta sorológica à infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV). Antígenos virais do capsídeo (VCA)-IgM são detectados na fase ativa da infecção e depois declinam na convalescença. O VCA-IgG aumenta ao mesmo tempo que o VCA-IgM, mas permanece positivo por toda a vida, indicando infecção passada. Os anticorpos dos antígenos nucleares de Epstein Barr (EBNA) são detectáveis tardiamente na fase da infecção e permanecem positivos. Anticorpos de antígenos precoces (EA) para a classe R ou D aumentam na fase aguda da infecção e diminuem após a convalescença.



Fonte: Adaptado de Smatti MK, et al 2018.

A proteína EBNA-1 é expressa em todas as células infectadas com EBV, e a IgG contra esta proteína é um marcador tardio da infecção por EBV (BALFOUR HH, et al., 2015). Os anticorpos EBNA-1 IgG aparecem tardiamente, 3 a 6 meses após o momento da doença, depois diminuem, mas continuam presentes em um nível detectável por toda a vida. Assim, a detecção de anticorpos EBNA-1 indica infecção por EBV passada ou em recuperação (BOUVARD V, et al., 2009; BALFOUR HH, et al., 2015). No entanto, VCA-IgG indica infecção passada com mais precisão do que EBNA-IgG porque EBNA-IgG nunca é desenvolvido em cerca de 5-10% dos indivíduos saudáveis infectados por EBV, e essa porcentagem é maior em pacientes imunocomprometidos (DUNMIRE SK, et al., 2015; BAUER G, et al., 2001).

Durante a transição da fase latente para a fase lítica da infecção, ocorre a expressão da proteína ZEBRA, considerada o principal fator de transcrição do EBV (HABIB M, et al., 2017). Esta proteína foi relatada como sendo importante marcador de infecção por ser expressa precocemente na infecção pelo EBV (CHEN J, et al., 2015). Existem ainda um outro conjunto de proteínas expressas de forma precoce

na infecção pelo EBV, conhecido como EA. Trata-se de um complexo de proteínas não estruturais que são expressas por células infectadas com EBV na fase lítica. O EA é composto por dois componentes: EA-D difuso e EA-R restrito (CROWLAY A, et al., 2012). Anticorpos IgG contra EA são detectados transitoriamente em até 3 meses ou mais durante a mononucleose da infecção (BAUER G, et al., 2001). Geralmente a resposta humoral é contra o componente D; no entanto, crianças submetidas a soroconversão silenciosa para EBV também podem produzir anticorpos para o componente R (DE PASCHALE M, et al., 2012; BIGGAR RJ, et al., 1978). Normalmente, os anticorpos EA aparecem na fase aguda e depois declinam para níveis indetectáveis (Adaptado de SMATTI MK, et al., 2018).

2 JUSTIFICATIVA

A malária é uma doença de grande impacto nas populações presentes em regiões mais pobres de países em desenvolvimento, particularmente da África, Ásia e América Latina. Nessas áreas a presença de outras infecções é comum, como infecções por vírus, bactérias e helmintos. Isso pode resultar frequentemente em coinfeções, que podem agravar ainda mais o estado de saúde das populações vulneráveis (SHANKARKUMA et al., 2011; BROOKER et al., 2007).

Estima-se que cerca de 90% dos adultos do mundo já tiveram um primeiro contato com o Epstein-Barr vírus (MASAKHWE et al., 2016). Em países em desenvolvimento, a primeira infecção pelo EBV ocorre mais frequentemente na primeira década de vida e, uma vez adquirida, a infecção permanece durante toda a vida do indivíduo (MORMANN & BAILEY, 2016). Na África, por exemplo, as crianças se tornam positivas para o vírus antes dos três anos de idade, e concomitantemente, estão expostas a intensa transmissão de malária por *P. falciparum*, uma vez que a malária tem elevada endemicidade no continente (REYNALD et al., 2016). Nesta situação, o *P. falciparum* é sabidamente considerado um cofator importante para o desenvolvimento do Linfoma de Burkitt chamado endêmico, forma de câncer infantil causada pelo EBV e frequente no continente africano (PIRIOU et al., 2012).

Até o momento, nenhum estudo demonstrou claramente que a infecção primária por EBV impacta negativamente o desenvolvimento de uma resposta imune específica para malária, incluindo para o *P. falciparum*. Por outro lado, evidências em malária murina sugerem que o vírus pode comprometer a resposta imune específica ao parasito (MATAR et al., 2015). Em contrapartida, não existem evidências de que outras espécies de plasmódios, como *P. vivax*, podem estar associadas a qualquer tipo de câncer relacionado ao EBV. Isto sugere que estes plasmódios têm peculiaridades biológicas importantes que resultam em quadros clínicos diferentes. No caso do *P. vivax*, até o momento, existe apenas um relato de caso associando a infecção por EBV com malária sintomática (AKIN et al., 2013).

Observando estas lacunas da literatura, particularmente no que se refere a associação *P.vivax* e EBV, nosso grupo de pesquisa iniciou um estudo-piloto para investigar se a presença do DNA viral de EBV durante a malária vivax poderia modificar o prognóstico da infecção malárica. De forma interessante, os achados

iniciais demonstraram que a presença do EBV no sangue periférico parece agravar a anemia e trombocitopenia causadas por *P. vivax* (FRANÇA-DIAS, 2018).

Neste sentido, pretendeu-se aqui ampliar os estudos de associação entre EBV e malária por *P. vivax*, focando na influência do vírus na resposta imune ao parasito. Particularmente, porque a principal célula hospedeira do EBV são as células B (MATAR C., *et al*; 2015), envolvidas diretamente na resposta humoral. Assim, a hipótese de trabalho foi que a detecção persistente do EBV no sangue circulante (i.e., presença de EBV-DNA circulante), poderia impactar as respostas de anticorpos naturalmente adquiridas para *P. vivax*, o parasito da malária humana geograficamente mais difundido (WHO., 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a associação entre o vírus Epstein-Barr e a malária por *Plasmodium vivax*, com ênfase na influência do EBV na aquisição de uma resposta imune humoral.

3.2 Objetivos Específicos

- (i) Avaliar a persistência do DNA circulante de Epstein-barr vírus em indivíduos com histórico de longa-exposição a malária na Amazônia brasileira;
- (ii) Em indivíduos bem caracterizados quanto a presença do EBV no sangue circulante, caracterizar o status sorológico de anticorpos anti- EBV;
- (iii) Determinar se a presença e intensidade do DNA viral circulante poderiam alterar resposta imune aos principais antígenos candidatos a vacina contra as formas sanguíneas do *P. vivax*;

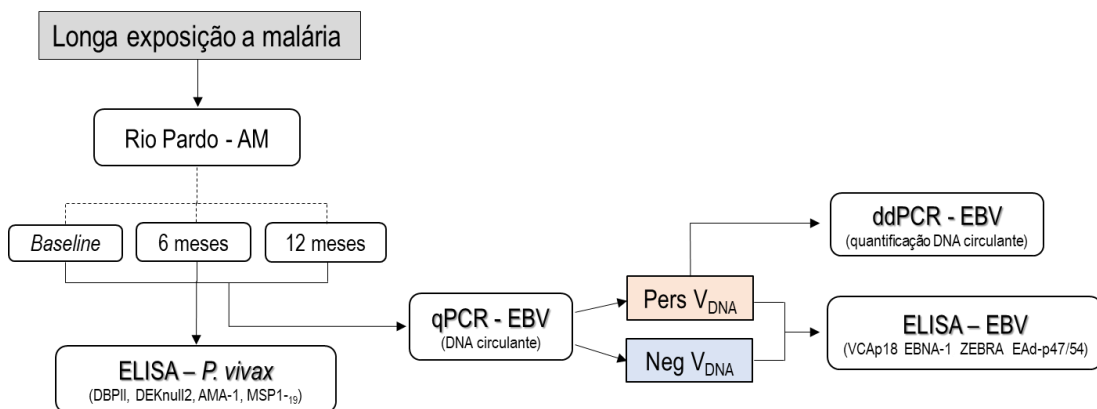
4 DESENHO METODOLÓGICO E ABORDAGEM EXPERIMENTAL

No presente estudo, foram incluídos indivíduos com histórico de longa exposição à malária, residentes em um assentamento agrícola do Estado do Amazonas (item 4.1), onde nosso grupo tem conduzido um estudo de base populacional de longa duração (KANO et al., 2012, 2016; SOUZA-SILVA et al., 2014). A metodologia envolveu avaliar em um primeiro momento, amostras dos indivíduos no primeiro corte do estudo (*baseline*), e posteriormente, fazer um acompanhamento da flutuação da carga viral com 6 e 12 meses. Inicialmente utilizou-se a metodologia de ELISA convencional para identificar indivíduos que possuem resposta de anticorpos anti-IgM e anti-IgG contra antígenos de fase sanguínea do *Plasmodium vivax*, tais como DBPII, DEKnull2, AMA-1 e MSP1-19 (4.3). A detecção de anticorpos através desta técnica foi realizada de acordo com protocolos padronizados no laboratório (CERÁVOLO et al., 2005).

Para identificar indivíduos que apresentam uma possível DNAmia de Epstein-Barr vírus (EBV), caracterizada aqui pela presença de DNA viral circulante de EBV, foi utilizada a metodologia de PCR em Tempo Real (qPCR) (item 4.2.2), que nos permitiu classificar os indivíduos de acordo com a persistência ou ausência do DNA viral circulantes nos três cortes, nos subgrupos *PersV_{DNA}* e *NegV_{DNA}*, respectivamente.

Em um segundo momento, buscou-se padronizar um ensaio sorológico através da técnica de sorologia convencional (ELISA)(item 4.2), para identificar nos indivíduos dos subgrupos determinados a presença de anticorpos anti-IgM e anti-IgG contra peptídeos de EBV, tais como VCAp18, EBNA-1, ZEBRA, EAd-p47/54-biotina. Posteriormente, utilizou-se a técnica de PCR digital (ddPCR) (item 4.5) para quantificar o DNA de EBV nos indivíduos com persistência de DNA circulante.

Figura 11. Fluxograma referente ao desenho experimental do estudo que visa identificar a presença do vírus Epstein-Barr (EBV) e avaliar possíveis influências na resposta imune aos principais antígenos de formas sanguíneas do *P. vivax*. Em um primeiro momento identificou-se a presença de anticorpos contra antígenos de fase sanguínea de *P. vivax* nos três cortes transversais do estudo *baseline*, 6 e 12 meses, através da metodologia de ELISA convencional. Posteriormente, realizou-se a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para a identificação do DNA viral circulante nos indivíduos no *baseline*, 6 e 12 meses, conforme protocolo descrito anteriormente. Nos dois subgrupos, estabelecidos de acordo com a presença ou ausência do DNA viral circulante nos três cortes (Pers V_{DNA} e Neg V_{DNA} respectivamente) foi utilizada a técnica de sorologia convencional (ELISA) para identificar a presença de anticorpos contra proteínas de EBV. Por fim, realizou-se a quantificação do DNA viral circulante “DNAmia”, nos três cortes transversais, para os indivíduos do grupo Pers V_{DNA}, através da técnica de PCR digital (ddPCR).

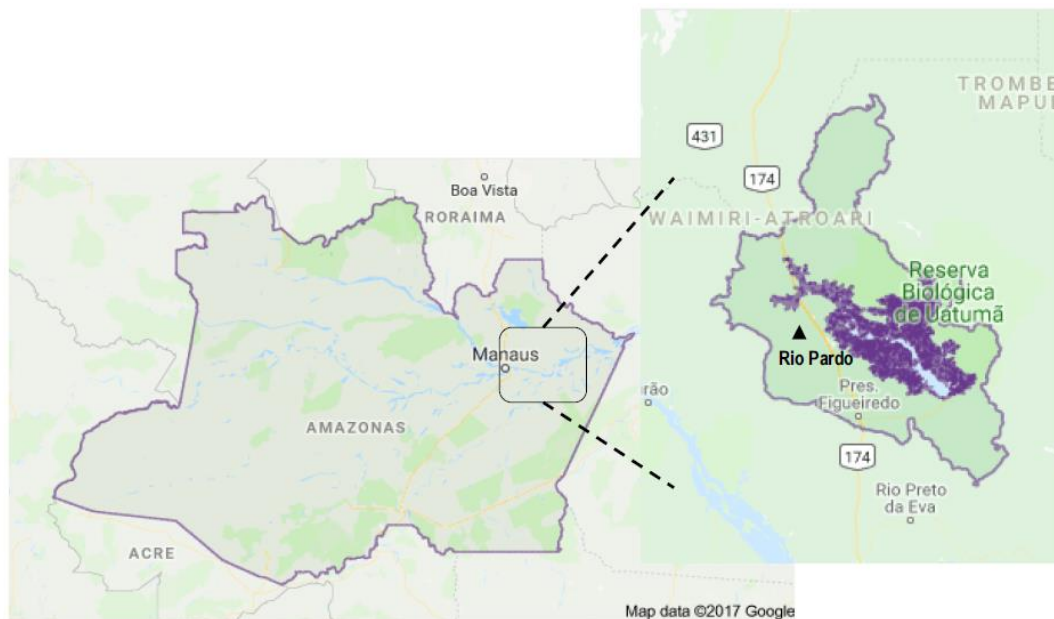


Fonte: elaborado pelo autor.

4.1 População e área de estudo

Este estudo foi realizado no assentamento agrícola de Rio Pardo, localizado no município de Presidente Figueiredo (Amazonas, Brasil), que fica a 160 km de Manaus (figura 10). A comunidade foi criada em 1996 como parte dos projetos de assentamento agrícola do Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA) (DE CASTRO et al., 2006). Atualmente, cerca de 120 famílias vivem no assentamento, incluindo famílias assentadas em áreas denominadas de “ramais” - vias não pavimentadas -, e às margens do Igarapé de Rio Pardo (população ribeirinha).

Figura 12. Mapa do estado do Amazonas, região da Amazônia Legal, mostrando a localização do assentamento agrícola de Rio Pardo (representado pelo triângulo preto), localizado no município de Presidente Figueiredo (representado em roxo), a aproximadamente 160 km de Manaus.



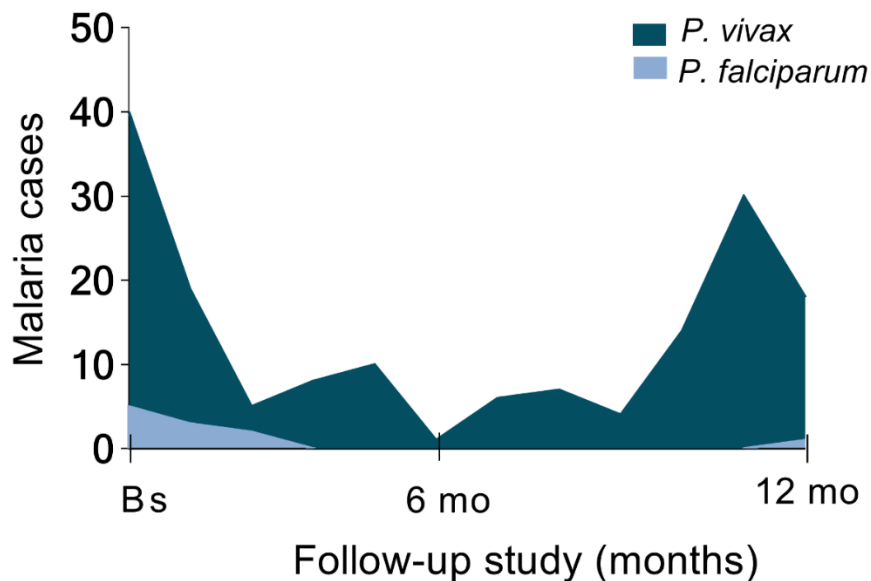
Fonte: adaptado de Kano et al., 2012.

Em novembro de 2008, o grupo de pesquisa em Biologia e Imunologia da Malária (BMIM) do IRR/FIOCRUZ iniciou um estudo de base populacional na população de Rio Pardo, cujo objetivo principal era caracterizar, do ponto de vista imunológico e epidemiológico, esta população que possui histórico de longa exposição à transmissão de malária. Resumidamente, para o estudo foram incluídos inquéritos transversais que foram realizados na área de acordo com os níveis de transmissão de malária. O desenho detalhado do estudo foi previamente descrito pelo grupo (Kano *et al.*, 2012; Souza-Silva *et al.*, 2014). Até o momento, foram realizados dez (10) inquéritos transversais, porém, para este trabalho baseou-se apenas no primeiro ano (2008-2009), contemplando a linha de base (novembro de 2008), e os inquéritos realizados após 6 e 12 meses.

Nessa área, a transmissão da malária é considerada hipo a mesoendêmica, com períodos de alta e baixa transmissão, e a maioria dos moradores eram nativos da região amazônica. A população local vive de agricultura de subsistência e da pesca em pequenos riachos, residindo em habitações pouco estruturadas (muitas vezes sem parede completa), o que torna ineficaz as medidas de controle do vetor baseadas em inseticidas residuais. (KANO *et al.*, 2012). Na área de estudo, a incidência de malária por *P. falciparum* diminuiu drasticamente nos últimos anos, e

P. vivax é agora responsável pela maior parte dos casos clínicos de malária relatados (Figura 13).

Figura 13: Série temporal de casos de malária no assentamento agrícola de Rio Pardo (Amazonas, Brasil) durante o período de estudo (Bs: baseline; 6 meses; 12 meses). O desenho do estudo incluiu três inquéritos transversais distribuídos em períodos de alta (Bs e 12 meses) e baixa transmissão de malária (6 meses). Os dados dos relatos de casos diagnosticados por microscopia foram fornecidos pelo Registro do Sistema Nacional de Vigilância da Malária (SIVEP-Malaria), com casos de *P. falciparum* (azul claro) e *P. vivax* (azul escuro) demonstrados.



Fonte: elaborado pelo autor.

Para o recrutamento dos voluntários (linha de base), os seguintes procedimentos foram realizados: (i) aplicação de um questionário estruturado para todos os voluntários a fim de obter dados demográficos, epidemiológicos e clínicos; (ii) exames físicos dos indivíduos, incluindo temperatura corporal e avaliação do tamanho do fígado e do baço; (iii) coleta de sangue venoso para indivíduos com idade igual ou superior a cinco anos (EDTA, 5 mL); e (iv) esfregaços de gota espessa corados por Giemsa para a presença de parasitas da malária por microscopia de luz convencional, com infecção por *P. vivax* confirmada por PCR em tempo real específico da espécie, conforme descrito anteriormente (AMARAL LC, et al., 2019). A localização geográfica de cada residência foi registrada usando um

sistema portátil de posicionamento global (GPS) de 12 canais (Garmin 12XL, Olathe, KS, EUA) com uma precisão posicional de 15 m.

Para o presente estudo, os critérios não elegíveis foram (i) recusa em assinar o consentimento informado; (ii) crianças, pois a imunidade clínica não é prevalente em crianças amazônicas (LADEIA-ANDRADE S, et al., 2009); (iii) gestantes; (iv) qualquer outra morbidade que possa ser rastreada; e (v) indivíduos que não puderam ser recrutados durante os três inquéritos transversais consecutivos.

Inicialmente, 360 participantes foram elegíveis para o presente estudo. A estratégia metodológica envolveu ainda a triagem desses indivíduos expostos à malária de acordo com a detecção de DNA viral circulante durante todas as pesquisas transversais (linha de base, 6 meses, 12 meses). Para o estudo atual, focamos em dois subgrupos de indivíduos expostos à malária (i) indivíduos cujo EBV-DNA pode ser detectado persistentemente no sangue periférico (PersV_{DNA}) e (ii) um subgrupo com a mesma idade cujo DNA viral não foi detectado em todo o período de acompanhamento (NegV_{DNA}). A tabela 1 descreve os dados demográficos, clínicos e epidemiológicos dos indivíduos e, de uma forma geral, a população foi constituída, principalmente por indivíduos adultos, de ambos os sexos, com uma mediana de 26 anos de residência na Amazônia. Em sua maioria, os indivíduos relataram ter tido cerca de 5 episódios prévios de malária, e através das técnicas de Gota Espessa e PCR, foi possível observar que apenas 12% dos indivíduos foram diagnosticados com malária neste período.

Tabela 1. Resumo dos dados demográficos, clínicos e epidemiológicos dos indivíduos com história de longa exposição ao *P. vivax*, residentes na comunidade de Rio Pardo, Amazonas.

	Longa exposição (n = 360)
Mediana de Idade, <i>anos (IQR)</i>	30 (14- 48)
Gênero, masculino / feminino	1.3/1
Mediana de residência em RP, <i>anos (IQR)</i>	8 (5-12)
Mediana de residência no AM, <i>anos (IQR)</i>	26 (14-44)
Indivíduos residentes no Igarapé, <i>n (%)</i>	55 (15%)
Episódios prévios de malária, <i>n (%)</i>	> 5 (58%)
Episódios de malária referida, <i>mediana (IQR)</i>	5 (2-11)
Casos positivos para malária, <i>n (%)</i> (Gota espessa e NRqPCR)	44 (12%)

Fonte: elaborado pelo autor.

4.1.1 Obtenção das amostras de plasma e DNA.

Ambas as amostras de Plasma e DNA, estão estocadas a -20°C no biorrepositório do Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária – IRR, Fiocruz Minas. Para a obtenção do DNA genômico dos indivíduos, o sangue total coletado em campo foi separado em alíquotas de 1mL, e a extração foi feita utilizando o kit QIAGEN (PUROGENE®, Genra Systems, Minneapolis, USA) seguindo as especificações do fabricante. Para a obtenção do plasma, o sangue total dos indivíduos foi coletado em tubos a vácuo contendo EDTA (Becton Dickinson, Rutherford, NJ), e após centrifugação (150 x g por 10min a 4°C), o plasma foi alíquotado e conservado a -20°C até o uso.

4.2 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos IgG contra proteínas recombinantes do *Plasmodium vivax*

O ensaio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para detecção de anticorpos IgG anti-DBP_{II}, anti-MSP1₁₉ e anti-AMA1 foi realizado utilizando-se soros dos indivíduos, de acordo com protocolos padronizados no laboratório (CERÁVOLO *et al.*, 2005). Resumidamente, as placas (Maxysorp, Nunc, Denmark) foram sensibilizadas com os antígenos de interesse na concentração de 3 µg/mL, e mantidas a 4°C por 12 horas. Posteriormente, as placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS 1x pH 7,2 + 0,05% Tween20 + 5% leite em pó desnatado) por 1 hora. Em seguida, as amostras de plasma diluídas 1:100 foram adicionados na placa e incubados durante 1 hora a 37°C. Após a incubação, as placas foram lavadas com PBST (PBS 1x + 0,05% Tween 20) e 100 µL do conjugado anti-IgG humano ligada à peroxidase (Sigma-Aldrich, A8792) na diluição de 1:5.000 foram adicionados. A revelação foi realizada com o-Phenylenediaminedihydrochloride (OPD-Sigma-Aldrich). Para detecção de anticorpos IgM humano específicos foi utilizado o mesmo protocolo e condições descritos acima para detecção de IgG, diferindo apenas no anticorpo secundário, o conjugado anti-IgM humano ligado a peroxidase (Sigma-Aldrich, A6907) diluído 1:10000.

Para os dois anticorpos, o cálculo do ponto de corte (*cut off*) para cada proteína foi calculado utilizando-se a média da Densidade Óptica (DO_{490nm}) de 30 soros de indivíduos negativos (não expostos à transmissão da malária) mais 3 vezes o desvio padrão. Indivíduos com Índice de Reatividade (médias das DOs sobre o valor do *cut off*) maior que 1, foram classificados como positivos.

4.2.1 Antígenos recombinantes usados no teste de ELISA (PvDBP_{II}, PvDEKnull2, PvMSP1-19, PvAMA1)

As proteínas DBP_{II} recombinantes (variantes Brz-1 e Sal-1), correspondendo a região do ligante da DBP (região II, aminoácidos 243 a 573, 39kDa), foram produzidas no Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária do IRR/Fiocruz, conforme protocolos bem estabelecidos e rotineiramente utilizados pelo

grupo (NTUMNGIA; ADAMS, 2012; SOUZA-SILVA et al., 2014). e se encontram estocadas em nosso biorrepositório, no Instituto René Rachou.

A DEKnull-2, um protótipo vacinal sintético de DBPII, foi produzido conforme descrito por Ntumngiae colaboradores(2017).

As proteínas *Plasmodium vivax merozoite surface protein* (PvMSP1₁₉) recombinante e *Plasmodium vivax apical membrane antigen 1* (PvAMA1) (aminoácido 43 até 487) foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Irene Soares da Universidade de São Paulo (USP), colaboradora do estudo.

4.3 Real-Time PCR (qPCR) para a detecção do vírus Epstein-Barr

4.3.1 Amostra controle para o Epstein-Barr vírus (EBV)

Como amostra controle positivo, foi utilizado material genético de EBV gentilmente cedido pela Dra. Talita Antônia Furtado Monteiro (Universidade Federal Do Para Belém, PA). O DNA viral (153 pares de base) foi extraído a partir de linfócitos B de paciente infectado. Como controles adicionais, foram utilizadas amostras de sangue de 10 indivíduos voluntários, residentes em Belo Horizonte (MG), com histórico prévio de diagnóstico clínico de mononucleose Infecciosa. Estas amostras com maior chance de positividade pelo EBV foram utilizadas para a padronização inicial do melhor protocolo para extração do DNA viral.

4.3.2 Protocolo de qPCR para identificação do DNA viral

Para a identificação do vírus nas amostras de DNA extraídas, foi utilizado um ensaio de PCR em tempo real descrito por Moormann e colaboradores em 2005, modificado por Reynaldi e colaboradores em 2016. Este protocolo utiliza um par de iniciadores e uma sonda (tabela 2) para a detecção de um alvo já bem descrito, que se baseia na amplificação do gene BALF-5, responsável pela codificação de uma proteína de replicação do DNA viral, expressa durante o ciclo lítico do EBV e que desempenha a função de DNA polimerase. Resumidamente, o DNA de amostras de sangue total coletadas em EDTA foi extraído usando o kit *Purogene blood core kit B* (Qiagen, Minneapolis, MN, EUA). A reação de PCR foi

realizada usando uma mistura contendo 1µL de DNA, 0,2 µM de cada iniciador, 0,1 µM de sonda fluorogênica e 5 µL de TaqMan Mater Mix (PE Applied Biosystems), e o ciclo de PCR foi realizado da seguinte forma: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. A mistura TaqMan Master (PE Applied Biosystems) foi usada para todas as reações. Inicialmente, foram utilizadas amostras de DNA controles, conforme descrito do item 4.3.1 e, em seguida, amostras de indivíduos com história de infecção pelo EBV. Neste sentido, a técnica foi padronizada no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, software versão 2.0.5), da Plataforma de PCR em Tempo Real, do Instituto René Rachou.

Tabela 2. Resumo dos primers e sequências de sondas para PCR em tempo real para amplificação do gene BALF-5 do vírus Epstein-Barr.

Alvo : Epstein-Barr vírus	
	Sequência
Iniciador <i>Foward</i>	5'CGGAAGCCCTCTGGACTTC3'
Iniciador <i>Reverse</i>	5'CCCTGTTTATCCGATGGAATG3'
Sonda	[FAM] TGTACACGCACGAGAAATGCGCC [TAMRA]

Fonte: elaborado pelo autor.

4.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para a detecção de anticorpos IgM e IgG contra peptídeos de Epstein-Barr vírus

4.4.1 Peptídeos sintéticos usados nos ensaios de ELISA

Os peptídeos sintéticos utilizados nos ensaios de ELISA, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jaap M. Middeldorp, pesquisador do Centro Médico Universitário de Amsterdam (Amsterdam UMC), colaborador do estudo. Os peptídeos sintéticos liofilizados *Viral Capside Antigen p-18* (EBV-VCAp18), *Epstein-Barr Nuclear Antigen* (EBV-EBNA-1), *Viral Capside Antigen p-18*, *Transactivation antigen Z (Zta)* (EBV-ZEBRA N-terminal) e *Early Antigen Reactivation* (EBV-EAd-p47/54-biotina) foram

dissolvidos e congelados a -80°C , e se encontram estocados no biorrepositório do nosso laboratório, no Instituto René Rachou.

4.4.2 Obtenção de amostras controle para o ensaio de ELISA de Epstein-Barr vírus (EBV)

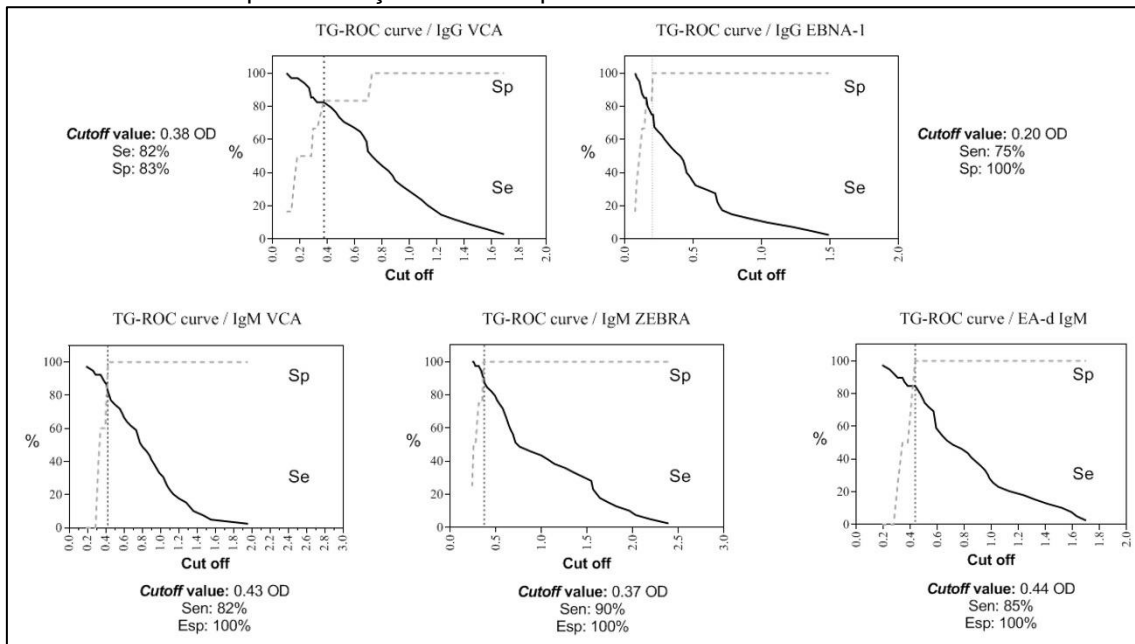
Como controle, foram utilizadas amostras de soro de indivíduos voluntários, residentes em Belo Horizonte (MG), que apresentaram ou não, diagnóstico clínico de mononucleose Infecciosa e qPCR positiva ou não para detecção do DNA viral. Estes indivíduos foram investigados quanto à presença de anticorpos IgG contra os peptídeos EBV-VCAp18 e EBV-EBNA-1, e IgM contra EBV-VCAp18, EBV-ZEBRA, EBV-EAd p45/52.

4.4.3 Padronização do ensaio de ELISA

O ensaio de ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG contra EBV-VCAp18, EBV-EBNA-1, EBV-ZEBRA N-terminal e EBV-EAd-p47/54-biotina, foi padronizado a partir do protocolo descrito por Fachiroh e colaboradores em 2006. Resumidamente, cada peptídeo foi usado na concentração final de $1\ \mu\text{g} / \text{mL}$ com amostras de plasma diluídas 1: 100. As reatividades de IgM (VCA, Zebra e EAd) e IgG (VCA e EBNA-1) foram determinadas usando anticorpo secundário IgM e IgG anti-humano conjugado comercial conjugado com peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich). Para cada peptídeo, foram utilizados soros de indivíduos voluntários, residentes em Belo Horizonte (MG), que apresentaram ou não, diagnóstico clínico de mononucleose Infecciosa, sendo EBV soronegativo ($n = 5$) e controles positivos ($n = 8$).

Curvas de características de operação do receptor (ROC) foram usadas para determinar os pontos de corte ideais para cada peptídeo (Figura 11). Com base na área sob a curva ROC (AUC), os seguintes pontos de corte de ELISA foram estabelecidos: (i) 0,38 para VCA IgG (sensibilidade de 82%; especificidade de 83%), (ii) 0,20 para EBNA-1 IgG (sensibilidade de 75%; 100 % de especificidade), (iii) 0,43 para VCA IgM (82% de sensibilidade; 100% de especificidade), (iv) 0,37 para ZEBRA IgM (90% de sensibilidade; 100% de especificidade) e (v) 0,44 para EA-d IgM (85% sensibilidade; 100% de especificidade).

Figura 14: Gráficos da curva TG-ROC estabelecidos (GrahPadPrism 9) para cada peptídeo utilizado no ensaio de ELISA para detecção de anticorpos de EBV.

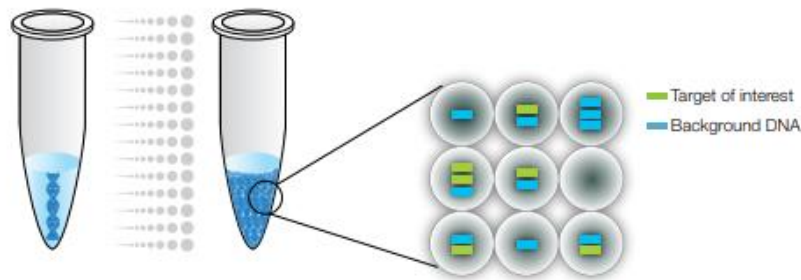


Fonte: elaborado pelo autor.

4.5 Droplet Digital PCR (ddPCR) para a quantificação do DNA de Epstein-Barr

A droplet PCR digital (ddPCR) combina a tecnologia de gotas, formadas a partir de uma emulsão água-óleo, e microfluídica, permitindo a separação das moléculas de DNA da amostra nas gotas dessa emulsão e a quantificação de moléculas alvo de maneira absoluta. Inicialmente, o gerador de gotas automático (Automated Droplet Generator, BIO-RAD) particiona cada amostra em 20 mil gotas uniformes. Em seguida, ocorre a amplificação do DNA particionado as milhares de gotas (figura 15), através do termociclador *C1000 Touch ThermalCycler*, BioRad, e que se comportam como reações de PCR individuais. Finalmente, as gotas são analisadas no leitor QX200 Droplet Reader (BIO-RAD) para determinar se contém ou não a sequência alvo por meio da detecção de fluorescência.

Figura 15: Desenho esquemático representando o processo de formação de gotas, onde uma única amostra de PCR é particionada em 20.000 gotas



Fonte: Adaptado de *Droplet Digital PCR – ApplicationsGuide – BioRad*).

4.5.1 Amostras controle

Para controle foram utilizadas as amostras selecionadas para controle do ensaio de qPCR, conforme demonstrado no item 4.3.1, onde para controle positivo, foi utilizado material genético de EBV extraído a partir de linfócitos B de paciente infectado. Como controles adicionais, foram utilizadas amostras de sangue de 10 indivíduos voluntários, residentes em Belo Horizonte (MG), com histórico prévio de diagnóstico clínico de mononucleose Infecciosa.

4.5.2 Padronização do protocolo de ddPCR

A técnica de ddPCR foi utilizada para quantificar o DNA circulante de Epstein-Barr vírus, através da determinação do número de cópias/ μL de DNA. O protocolo sugerido pela BioRad consiste no preparo da reação de PCR utilizando alguns reagentes, previamente descongelados em temperatura ambiente, e homogeneizados para desfazer o gradiente de concentração formado pelo congelamento à -20°C . A reação de PCR foi realizada usando uma mistura contendo $2\mu\text{L}$ de DNA, $0,9\mu\text{M}$ de cada iniciador, $0,25\mu\text{M}$ de sonda fluorogênica e $10\mu\text{L}$ de *2xddPCR SuperMix for Probes (No DUTP - BioRad)*, para um volume final de $20\mu\text{L}$. A ciclagem também seguiu o protocolo padrão da BioRad para reação com sonda, com alteração apenas da temperatura de anelamento dos *primers*, que demonstrou melhor desempenho a 55°C . Desta maneira, o protocolo foi utilizado da seguinte

forma: (i) 10 minutos a 95°C para abertura das fitas de DNA, (ii) 30 segundos a 94°C garantir a abertura das fitas, (iii) 1 minuto a 55°C para anelamento dos iniciadores e extensão da nova fita, (iv) mais 39 ciclos dos passos (ii) e (iii), (v) 10 minutos a 98°C para o endurecimento das gotas e, finalmente, a temperatura de 12°C é mantida até o momento da retirada da reação. A técnica foi padronizada utilizando os equipamentos do sistema *QX200 Droplet Digital PCR* - BioRad, da Plataforma de PCR em Tempo Real, do Instituto René Rachou.

4.6 Análises de dados

Neste estudo, verificou-se uma possível associação entre vírus Epstein Barr e malária por *Plasmodium vivax*, e seu efeito sobre parâmetros imunológicos de pacientes. Um banco de dados foi construído com as informações obtidas dos pacientes (pacote estatístico EpiData 2002).

Para tanto, foram feitas análises univariadas para comparação de medianas, utilizando-se os testes não paramétricos de Kruska-Wallis ou Mann-Whitney, quando os grupos não apresentaram distribuição normal, e os testes *t de student* ou ANOVA em caso de distribuição normal dos dados. A fim de comparar proporções, realizou-se o teste qui-quadrado (χ^2) ou, quando necessário, o teste Exato de Fisher. As análises de correlação foram examinadas pelas matrizes de *Spearman*. Todos os testes consideraram nível de significância de 5%, ou seja, valores de $P < 0,05$. A análise das curvas características de operação do receptor (ROC) foi usada para determinar os valores de corte ótimos para peptídeos de EBV em ensaios ELISA. O software utilizado nas análises estatísticas foi *GraphPad (InStat 4.0; Prism9.0)*.

5 RESULTADOS

5.1 Características dos grupos expostos à malária por *Plasmodium vivax*

Com o intuito de verificar a persistência do DNA circulante de EBV (EBV-DNA), amostras de DNA total dos 360 indivíduos elegíveis para o estudo foram avaliadas através da técnica de qPCR – EBV (item 4.3) em todas as pesquisas transversais (linha de base, 6 meses, 12 meses). No período do primeiro levantamento transversal, 123 (34%) dos 360 indivíduos amazônicos apresentaram o EBV-DNA detectável no sangue periférico. Pesquisas posteriores (6 e 12 meses depois) identificaram 27 de 123 indivíduos como portadores persistentes de DNA viral, ou seja, indivíduos cujo EBV-DNA foi amplificado no sangue periférico durante todo o período de acompanhamento (PersV_{DNA}). Paralelamente, selecionou-se um grupo de 29 indivíduos representativos da população exposta, cujo DNA viral nunca pôde ser detectado no sangue periférico (NegV_{DNA}); este grupo foi pareado por idade com o grupo PersV_{DNA}. Como ilustrado na Tabela 1, as características demográficas, parasitológicas e epidemiológicas foram comparáveis entre os grupos. A maioria dos indivíduos eram adultos, com proporção semelhante entre homens/mulheres, e idade correspondendo basicamente ao tempo de exposição à malária na região amazônica (medianas de 32 e 33 anos para PersV_{DNA} e NegV_{DNA}, respectivamente). Nestes indivíduos, com histórico de longa-exposição à malária, poucas infecções agudas foram detectadas durante o período de acompanhamento, sendo a totalidade causada por *P. vivax*, conforme identificado pela microscopia e/ou ensaio de PCR espécie-específico (Tabela 1).

Tabela 3. Dados demográficos, epidemiológicos e parasitológicos de indivíduos expostos à malária cujo EBV-DNA pôde ser detectado (PerVDNA) ou não (NegVDNA) no sangue periférico durante o período de acompanhamento de 12 meses.

	PerV_{DNA} (n = 27)	NegV_{DNA} (n =29)	<i>p</i> valor
Características			
Idade, mediana, anos (<i>IQR</i>) ^a	38 (22- 54)	33 (27- 42)	<i>p</i> = 0.1227
Sexo,masculino:feminino	1.5/1	0.9/1	<i>p</i> = 0.4357
Tempo de exposição à malária (anos), mediana (<i>IQR</i>) ^b	32 (16-51)	33 (25-40)	<i>p</i> = 0.7233
Tempo de residência em Rio Pardo (anos), mediana(<i>IQR</i>) ^c	8 (4-10)	9 (3-14)	<i>p</i> = 0.2326
População ribeirinha, <i>n</i> (%) ^d	4 (15%)	6 (21%)	<i>p</i> = 0.7308
Episódios de malária relatados,mediana (<i>IQR</i>)	5 (2-11)	11 (3-21)	<i>p</i> = 0.1410
Infecção aguda por <i>Plasmodium vivax</i> , <i>n</i> (%) ^e			
<i>Baseline</i>	6 (22%)	6 (21%)	
6 meses	1 (4%)	3 (10%)	
12 meses	4 (15%)	5 (17%)	

^a IQR = Intervalo Interquartil;

^bTempo de vidana área endêmica (Amazônia brasileira);

^cTempo de residência na área de assentamento agrícola;

^dPopulação que vive ao longo do Rio Pardo;

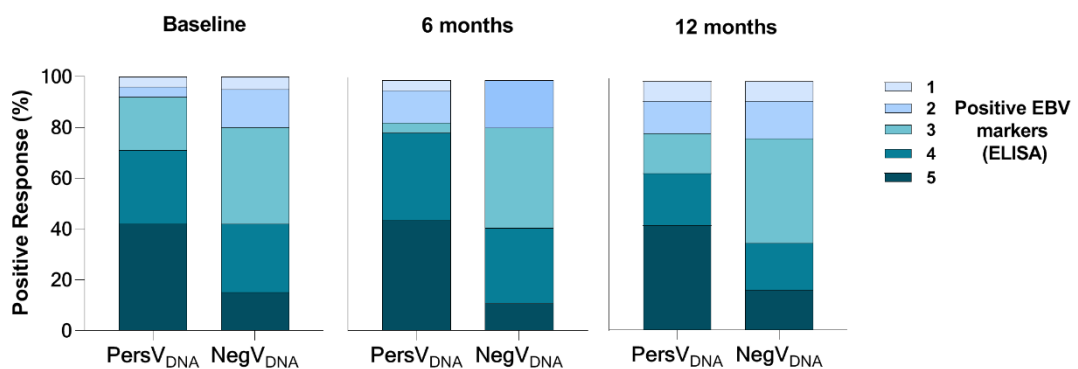
^eA infecção por malária foi detectada por microscopia de luz convencional e PCR em tempo real.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 Perfil sorológico de EBV nos grupos expostos à malária por *P.vivax*

Visando caracterizar o perfil sorológico de EBV nos grupos estudados, avaliou-se, através do ensaio de ELISA (item 4.4), a resposta de anticorpos IgM e IgG contra peptídeos sintéticos de EBV (item 4.4.1). Como era de esperar, todos os indivíduos dos grupos PersV_{DNA} ou NegV_{DNA} foram soropositivos para pelo menos um peptídeo de EBV durante o estudo (Figura 16).

Figura 16: Frequência de anticorpos anti-EBV de acordo com o número de marcadores sorológicos reconhecidos pelos indivíduos cujo EBV-DNA pode ser detectado (PersV_{DNA}) ou não (NegV_{DNA}) ao longo do período de seguimento. Para cada grupo, os resultados foram apresentados como a proporção de respondedores para um (1), dois (2), três (3), quatro (4) ou cinco (5) marcadores sorológicos de EBV [IgM (VCA-p18, Zebra e EAd) -p45/52) e IgG (VCA-p18 e EBNA-1)].

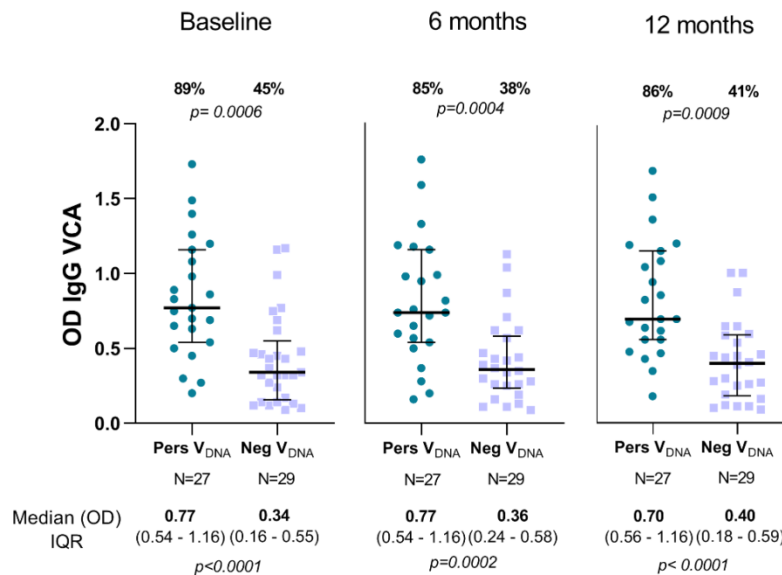


Fonte: elaborado pelo autor.

Apesar disso, os indivíduos classificados como PersV_{DNA} tiveram uma resposta de anticorpos EBV mais ampla, já que 42% dos portadores de EBV-DNA respondem a todos os cinco marcadores usados no EBV-ELISA versus 15% do grupo NegV_{DNA} (teste qui-quadrado = 4,276; $p = 0,038$). Este perfil discrepante de resposta entre os grupos PersV_{DNA} e NegV_{DNA} foi mantido ao longo do estudo de coorte (Figura 13.)

Entre os 4 antígenos de EBV utilizados aqui, apenas a resposta de IgG ao antígeno lítico VCA-p18 permitiu uma clara diferenciação entre os grupos PersV_{DNA} e NegV_{DNA} (Figura 17).

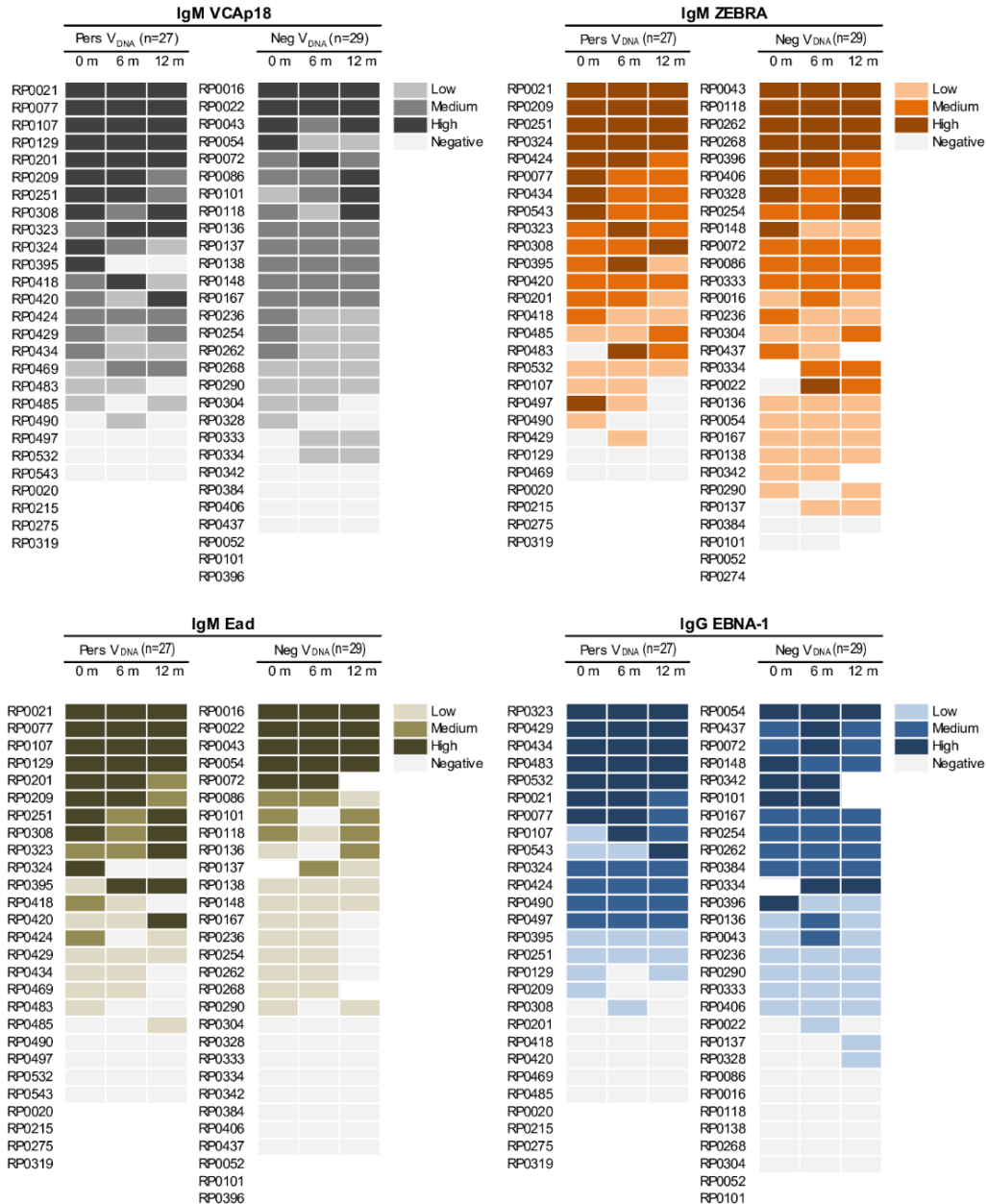
Figura 17: Variação temporal nos níveis de anticorpos IgG contra o antígeno capsídeo viral (VCA) do vírus Epstein-Barr em indivíduos com (PersVDNA) ou sem persistência do DNA viral (NegVDNA) durante o período do estudo (baseline, 6 e 12 meses). Em cada gráfico, a resposta de anticorpos detectados no Elisa está representada pela densidade ótica (OD a 450 nm), sendo os valores individuais representados por pontos, com a mediana e o intervalo interquartil (IQR) representados por linhas transversais. Abaixo de cada gráfico, foram incluídos os valores da mediana e IQR, com diferenças entre grupos representadas pelos valores de p (teste de Mann-Whitney). A proporção de respondedores para cada grupo foi incluída no topo de cada gráfico com as diferenças entre grupos avaliadas pelo teste qui-quadrado (valores p). A positividade no Elisa foi estimada como OD > 0,38 conforme descrito nos métodos.



Fonte: elaborado pelo autor.

No *baseline*, enquanto 89% dos PersVDNA tinham uma resposta positiva de anticorpos IgG para VCA-p18, apenas 45% dos NegVDNA apresentaram resposta ao peptídeo (teste qui-quadrado; $p = 0,0006$). De forma interessante, a diferença na resposta entre os grupos permaneceu constante durante todo o período de acompanhamento. Os níveis de anticorpos para VCA-p18 também foram significativamente diferentes entre os grupos (teste de Mann-Whitney), com níveis variando de 0,70 a 0,77 para PersVDNA e de 0,34 a 0,40 para NegVDNA (Figura 17). Embora anticorpos IgM para antígenos líticos de EBV (VCA-p18, EAd-p45/52 e Zebra) não tenham sido capazes de diferenciar os grupos de estudo, em nível individual, uma resposta IgM positiva para um antígeno de EBV foi relacionada à positividade para os outros (Figura 18). Notavelmente, este perfil de resposta IgM foi mantido durante todo o período de observação.

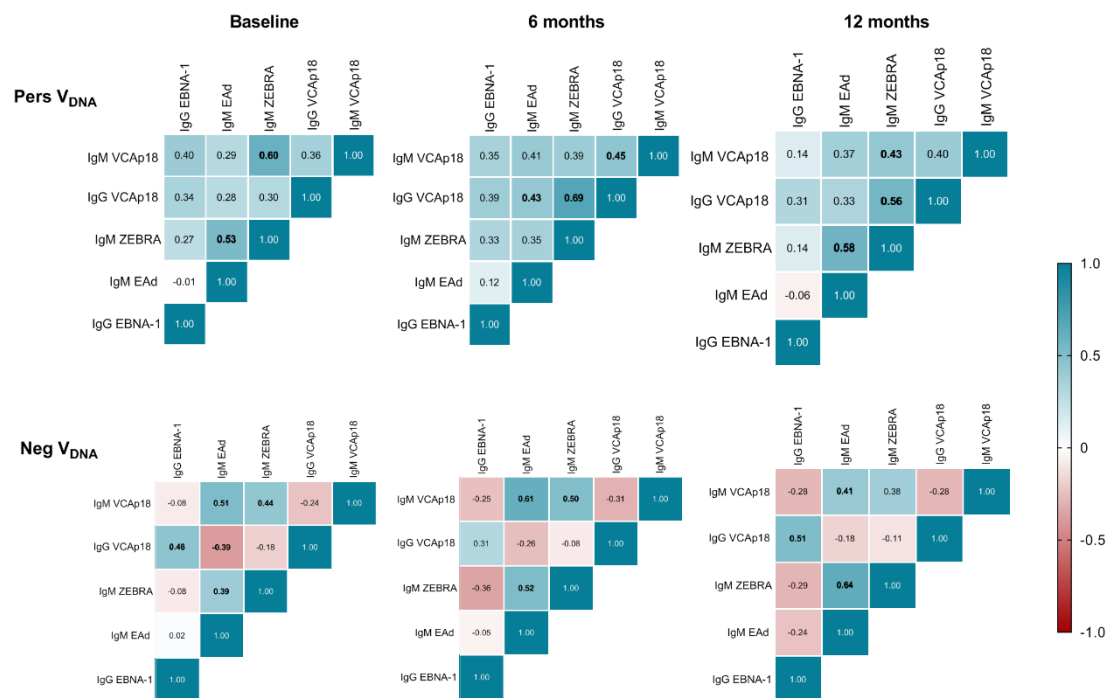
Figura 18: Resposta individual de anticorpos aos peptídeos do vírus Epstein-Barr (EBV) (VCA-p18, ZEBRA, EAad-p45/52 e EBNA-1) durante os cortes transversais. Os mapas de calor ilustraram a resposta individual de anticorpos de cada indivíduo exposto à malária classificado de acordo com a detecção (Pers_{V_{DNA}}) ou não (Neg_{V_{DNA}}) de EBV-DNA durante o período de acompanhamento. De acordo com a resposta de anticorpos ao EBV, os indivíduos foram categorizados como não respondedores (negativos) ou respondedores (estratificados em baixa, média ou alta, de acordo com a reatividade do anticorpo ao EBV – valores determinados através do tercil). Os valores ausentes são registrados como espaços em branco.



Fonte: elaborado pelo autor.

Além disso, comparamos o padrão de respostas de anticorpos a todos os antígenos de EBV entre PersV_{DNA} e NegV_{DNA} (Figura 19). No grupo PersV_{DNA}, houve tendência de correlação positiva entre anticorpos específicos para EBV, principalmente para anticorpos IgM. Ao contrário, o grupo NegV_{DNA} foi caracterizado por uma predominância de correlações negativas de anticorpos para vários antígenos de EBV.

Figura 19: Correlações pareadas entre os níveis de anticorpos EBV registrados em indivíduos com e sem DNA viral persistente durante as pesquisas transversais. O agrupamento foi baseado no coeficiente de correlação de Spearman para ensaios que medem anticorpos anti-EBV no soro. As correlações entre as proteínas do EBV nos subgrupos de DNA viral persistente e não persistente estão representadas na primeira e segunda linhas, respectivamente. Azul indica correlação positiva e vermelho indica correlação negativa, e os números em negrito representam correlações estatisticamente significativas.

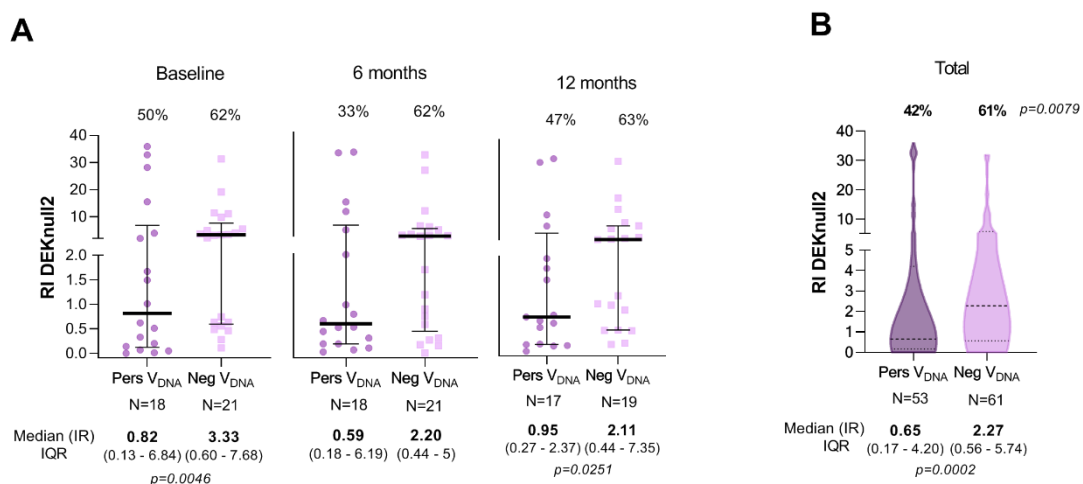


Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 Perfil de reposta de anticorpos específicos contra antígenos de *P. vivax* em indivíduos com DNA viral persistente

Na próxima etapa, investigou-se se a detecção contínua de EBV-DNA no sangue periférico poderia afetar a resposta humoral específica aos antígenos de *P. vivax*. Para isso avaliou-se, através do ensaio de ELISA (item 4.2), anticorpos contra os principais candidatos a vacinas de estágio sanguíneo de *P. vivax* (antígenos relacionados a DBP II, AMA-1 e MSP1- 19) (item 1.2.1). Em geral, não foram observadas diferenças significativas na frequência de respondedores entre os grupos, no entanto, os níveis de anticorpos aos diferentes antígenos de *P. vivax* foram significativamente diferentes entre Pers_{VDNA} e Neg_{VDNA}.

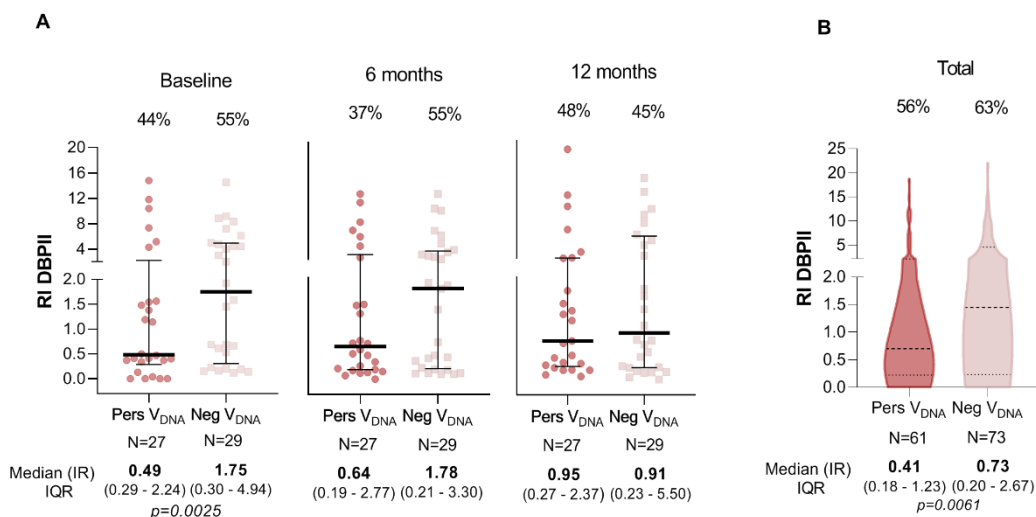
Figura 20: Variação temporal nos níveis de anticorpos IgG contra DEKnull-2 de *P. vivax* em indivíduos com (Pers_{VDNA}) ou sem persistência do DNA viral (Neg_{VDNA}) durante o período do estudo (baseline, 6 e 12 meses). Em cada gráfico, a resposta de anticorpos detectados no Elisa está representada pelo índice de reatividade (IR > 1 como resposta positiva), sendo os valores individuais representados por pontos, com a mediana e o intervalo interquartil (IQR) representados por linhas transversais. Abaixo de cada gráfico, foram incluídos os valores da mediana e IQR, com diferenças entre grupos representadas pelos valores de p (teste de Mann-Whitney). Em (A) está representada a amplitude de resposta individual para os dois grupos durante o período de estudo, e em (B) os gráficos de Violino Plot representam a amplitude de resposta total das amostras. A proporção de respondedores para cada grupo foi incluída no topo de cada gráfico com as diferenças entre grupos avaliadas pelo teste qui-quadrado (valores p).



Fonte: elaborado pelo autor.

Interessantemente, a resposta de anticorpos contra o novo imunógeno baseado na DBPII (DEKnull-2) mostrou uma tendência para níveis mais baixos de PersV_{DNA} em comparação com NegV_{DNA} (Figura 20). Especificamente, enquanto os índices de reatividade sorológica (RI) de DEKnull-2 variaram de 0,59 a 0,95 para PersV_{DNA}, os valores de RI variaram de 2,11 a 3 para o grupo NegV_{DNA}. Considerando todas as amostras analisadas, a frequência de positividade foi de 40% vs. 61% (teste qui-quadrado, $p=0,0079$) para amostras PersV_{DNA} e NegV_{DNA}, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos para a proteína DBPII original (Figura 21).

Figura 21: Variação temporal nos níveis de anticorpos IgG contra DBPII de *P. vivax* indivíduos com (PersVDNA) ou sem persistência do DNA viral (NegVDNA) durante o período do estudo (baseline, 6 e 12 meses). Em cada gráfico, a resposta de anticorpos detectados no Elisa está representada pelo índice de reatividade (IR>1 como resposta positiva), sendo os valores individuais representados por pontos, com a mediana e o intervalo interquartil (IQR) representados por linhas transversais. Abaixo de cada gráfico, foram incluídos os valores da mediana e IQR, com diferenças entre grupos representadas pelos valores de p (teste de Mann-Whitney). Os gráficos de ScatterPlot (A) representam a amplitude de resposta individual para os dois grupos durante o período de estudo, e (B) os gráficos de Violino Plot representam a amplitude de resposta total das amostras. A proporção de respondedores para cada grupo foi incluída no topo de cada gráfico com as diferenças entre grupos avaliadas pelo teste qui-quadrado (valores p).

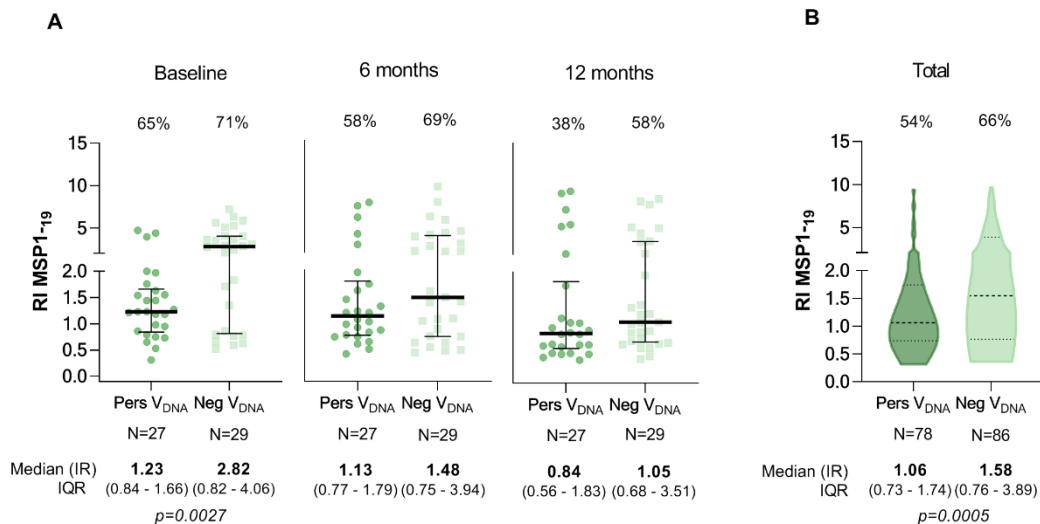


Fonte: elaborado pelo autor.

Considerando as proteínas mais imunogênicas de *P. vivax*, como a MSP1-19, a diferença entre os grupos foi menos pronunciada (Figura 22), com diferenças estatisticamente significativas observadas apenas durante o período de alta

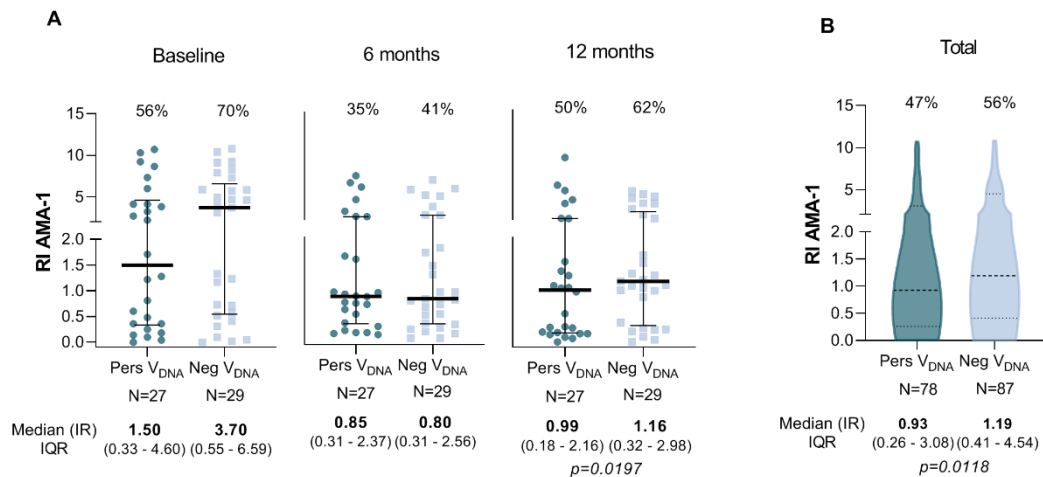
transmissão na linha de base do estudo (Figura 22). Os anticorpos circulantes contra AMA-1 apresentaram um padrão de resposta semelhante (Figura 23).

Figura 22: Variação temporal nos níveis de anticorpos IgG contra MSP1-19 de *P. vivax* em indivíduos com (PersVDNA) ou sem persistência do DNA viral (NegVDNA) durante o período do estudo (baseline, 6 e 12 meses). Em cada gráfico, a resposta de anticorpos detectados no Elisa está representada pelo índice de reatividade (IR > 1 como resposta positiva), sendo os valores individuais representados por pontos, com a mediana e o intervalo interquartil (IQR) representados por linhas transversais. Abaixo de cada gráfico, foram incluídos os valores da mediana e IQR, com diferenças entre grupos representadas pelos valores de p (teste de Mann-Whitney). Os gráficos de ScatterPlot (A) representam a amplitude de resposta individual para os dois grupos durante o período de estudo, e (B) os gráficos de Violino Plot representam a amplitude de resposta total das amostras. A proporção de respondedores para cada grupo foi incluída no topo de cada gráfico com as diferenças entre grupos avaliadas pelo teste qui-quadrado (valores p).



Fonte: elaborado pelo autor.

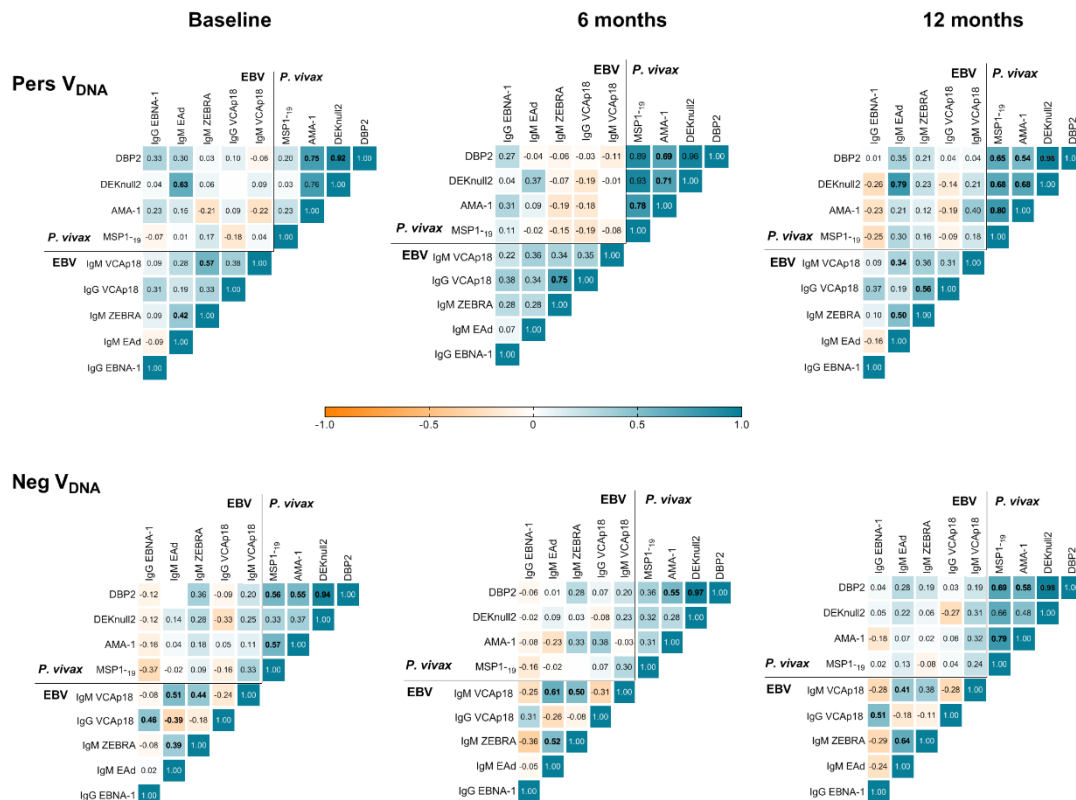
Figura 23: Variação temporal nos níveis de anticorpos IgG contra AMA-1 de *P. vivax* em indivíduos com (PersVDNA) ou sem persistência do DNA viral (NegVDNA) durante o período do estudo (baseline, 6 e 12 meses). Em cada gráfico, a resposta de anticorpos detectados no Elisa está representada pelo índice de reatividade (IR>1 como resposta positiva), sendo os valores individuais representados por pontos, com a mediana e o intervalo interquartil (IQR) representados por linhas transversais. Abaixo de cada gráfico, foram incluídos os valores da mediana e IQR, com diferenças entre grupos representadas pelos valores de p (teste de Mann-Whitney). Os gráficos de ScatterPlot (A) representam a amplitude de resposta individual para os dois grupos durante o período de estudo, e (B) os gráficos de Violino Plot representam a amplitude de resposta total das amostras. A proporção de respondedores para cada grupo foi incluída no topo de cada gráfico com as diferenças entre grupos avaliadas pelo teste qui-quadrado (valores p).



Fonte: elaborado pelo autor.

Independentemente da detecção de EBV-DNA no sangue periférico, anticorpos contra antígenos sanguíneos de *P. vivax* não se correlacionaram com o padrão de anticorpos EBV. Em ambos os grupos, a resposta de anticorpos aos antígenos do estágio sanguíneo de *P. vivax* resultou em correlações fracas com o padrão IgG EBV (Figura 24).

Figura 24: Correlações pareadas entre os níveis de anticorpos EBV e *P. vivax* em indivíduos com (PersV_{DNA}) ou sem (NegV_{DNA}) DNA viral persistente durante os inquéritos transversais. O agrupamento foi baseado no coeficiente de correlação de Spearman para ensaios que medem anticorpos anti-EBV no soro. Mapas de calor de matriz foram mostrados para cada pesquisa transversal (linha de base, 6 e 12 meses), com os painéis superior e inferior representando os grupos PersV_{DNA} e NegV_{DNA}, respectivamente. Correlações positivas mostradas em azul e correlações negativas mostradas em laranja, com números em negrito diferenças estatisticamente significativas.



Fonte: elaborado pelo autor.

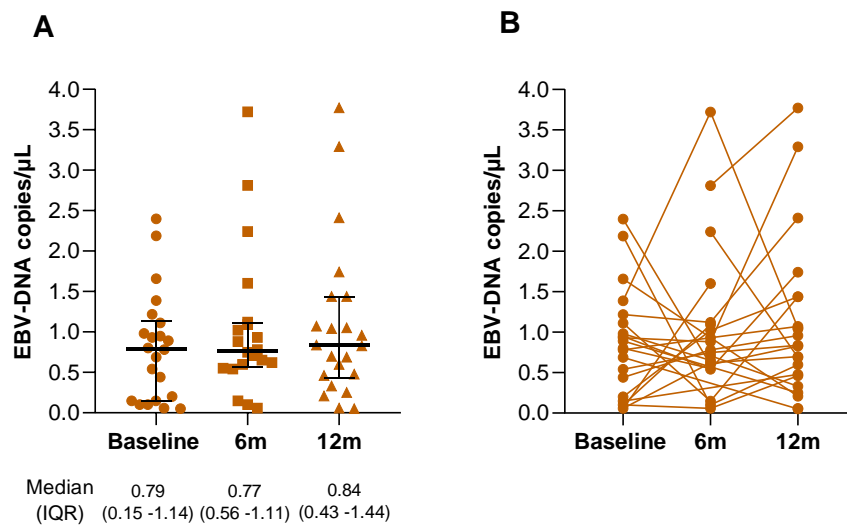
5.4 Número de cópias de EBV-DNA versus níveis de anticorpos

Considerando que a presença do DNA viral circulante influenciou na resposta de anticorpos contra antígenos de *P. vivax*, buscou-se avaliar se o número de cópias do DNA viral (item 4.5) poderia correlacionar com a resposta de anticorpos específicos.

Para tal, o número de cópias de DNA viral foi avaliado nos indivíduos do grupo PersV_{DNA}. Como mostrado na Figura 22A, o número de cópias/μL do DNA viral no sangue circulante deste grupo não apresentou diferenças significativas entre os cortes transversais, com valores variando entre 0.77 e 0.84 ($p=0.6993$) (figura 25A),

e na maior parte dos indivíduos, os níveis de DNA se mantiveram estáveis ao longo do estudo (figura 25B).

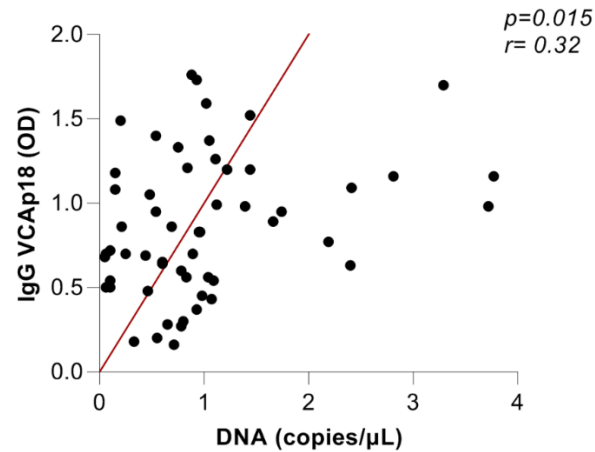
Figura 25: Características da quantificação do DNA viral de EBV em indivíduos com detecção persistente do genoma viral (PersV_{DNA}). (A) representa a amplitude do DNA viral demonstrada pelos valores da mediana e do intervalo interquartil abaixo de cada corte transversal, e (B) representa o acompanhamento dos níveis individuais de DNA viral ao longo do estudo. Os resultados da ddPCR foram demonstrados em número de cópias/ μ L.



Fonte: elaborado pelo autor.

Na amostra estudada, anticorpos anti-VCAp18 se correlacionaram positivamente com número de cópias/ μ L do DNA viral ($p=0.015$, $r=0.32$); entretanto anticorpos contra os demais peptídeos virais não se correlacionaram com as quantidades de DNA viral circulando no sangue periférico (figura 26).

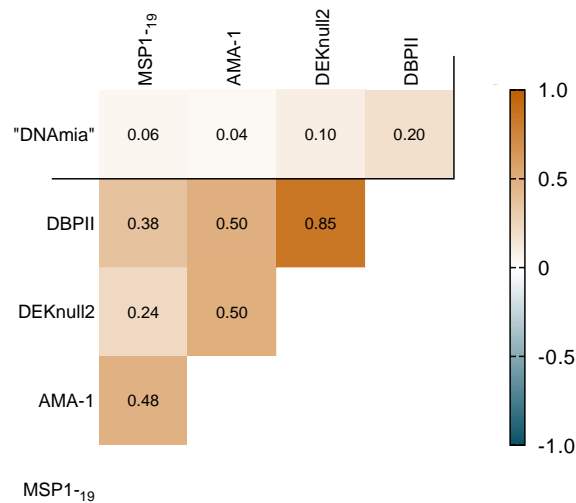
Figura 26: Correlação entre o peptídeo de VCA-p18 e o DNA viral circulante, de EBV, nas amostras dos indivíduos com genoma viral persistente. A associação entre o peptídeo sintético de EBV (VCAp-18) e o número de cópias/ μ L DNA viral, foi baseada no coeficiente de correlação de Spearman para ensaios que medem anticorpos no soro. O gráfico de correlação foi desenhado para as amostras de todos os cortes transversais estudados (baseline, 6 e 12 meses), com resultados positivos expressos por valor de $p < 0.05$ e com valores de r demonstrando correlações positivas ou negativas.



Fonte: elaborado pelo autor.

Finalmente, foi possível demonstrar que número de cópias/ μ L do DNA viral não se correlacionou (positiva ou negativamente) com a resposta de anticorpos contra qualquer uma das proteínas de *P. vivax* (figura 24).

Figura 27: Correlação entre os níveis de anticorpos de *P. vivax* e número de cópias/ μ L de EBV-DNA circulante (“DNAmia”) nas amostras dos indivíduos com genoma viral persistente. A associação entre as proteínas de *P. vivax* e o DNA viral detectado foi baseada no coeficiente de correlação de Spearman para ensaios que medem anticorpos no soro. A matriz de correlação foi demonstrada para as amostras de todos os cortes transversais estudados (baseline, 6 e 12 meses). Correlações positivas são mostradas em laranja e correlações negativas mostradas em azul



Fonte: elaborado pelo autor.

6. DISCUSSÃO

Populações de países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, estão frequentemente expostas a infecções por mais de um patógeno. Essas coinfeções podem ter consequências consideráveis na evolução do quadro clínico do indivíduo, dificultando o diagnóstico e o tratamento específico (VAUMOURIN et al., 2015). Estudos têm mostrado que o impacto das coinfeções envolvendo a malária é maior em populações que vivem nas regiões mais pobres do mundo, como é o caso do continente africano, onde é alta a prevalência de outros agentes patogênicos (SHANKARKUMAR et al., 2011; BROOKER et al., 2007).

No que se refere a infecções envolvendo malária e vírus, nota-se que grande parte dos estudos tem avaliado a associação entre *P. falciparum* e HIV ou o Epstein-barr vírus (EBV). Em estudos que envolvem infecções por *P. falciparum* e HIV/Aids, os resultados de evolução do quadro clínico do indivíduo ainda são conflitantes, podendo ou não resultar em elevadas parasitemias e baixos índices hematimétricos (MBALE et al., 2016; TAY et al., 2015; RATTANAPUNYA et al., 2015; FRISCHKNECHT & FACKLER, 2016). Por outro lado, a associação *P. falciparum*/EBV levando ao linfoma de Burkitt em crianças africanas está bem estabelecida (MOORMANN et al., 2011). Apesar de o EBV ser considerado um vírus altamente prevalente da população mundial (MASAKHWE et al., 2016), apenas no continente africano, onde a transmissão de malária é hiperendêmica, o vírus está associado a esta modalidade de linfoma denominado Burkitt endêmico (MOORMANN et al., 2011; PIRIOU et al., 2012; ROBBIANI et al., 2015).

Na Amazônia, tanto a malária quanto as infecções por Epstein-Barr vírus são comuns, mas o linfoma de Burkitt (LB) é raro (GONÇALVES RM., et al., 2014) uma vez que está ligado à exposição ao *P. falciparum*, mas não a outros parasitas da malária (QUINTANA et al., 2020), como *P. vivax*. Até o momento, existe apenas um relato de caso clínico associando a infecção pelo EBV com malária sintomática (AKIN et al., 2013). Uma vez que *P. vivax* é a espécie de plasmódio prevalente no Brasil, e que a malária causada por este parasito seja considerada um problema de saúde pública na Amazônia, os resultados imunológicos de coinfeções virais prevalentes são frequentemente negligenciados (CRUZ LAB., et al., 2019; DEL-TEJO PL., et al., 2021; CERAVOLO IP., et al., 2009).

Neste sentido, este estudo propôs investigar se uma detecção contínua do DNA circulante do Epstein-Barr vírus no sangue periférico de adultos expostos à malária por *P. vivax* (PersV_{DNA}) poderia impactar a resposta de anticorpos para as principais vacinas candidatas ao estágio sanguíneo de *P. vivax*.

6.1 Detecção do DNA viral circulante nos indivíduos dos grupos expostos ao *P. vivax*

Os indivíduos aqui estudados eram adultos e imunocompetentes, cuja idade refletiu o tempo de exposição à malária. Este longo tempo de exposição pode explicar os poucos casos de malária aguda registrados na população de estudo. De fato, os indivíduos frequentemente expostos ao parasito tendem a desenvolver uma proteção clínica contra os sintomas graves da doença, (MARSH e KINYANJUI, 2006; WEISS *et al.*, 2010; ASHLEY EA *et al.*, 2018; ANTONELLI *et al.*, 2019), sendo considerados assim indivíduos semi-imunes, podendo apresentar baixos níveis de parasitemia detectadas, em geral, pelas técnicas moleculares mais sensíveis (BOUSEMA T. *et al.*, 2014).

Tendo em vista que o EBV é um vírus linfotrópico, mantendo-se em latência nos linfócitos B ao longo da vida do indivíduo infectado (MATAR *et al.*; 2015), buscou-se aqui, verificar a persistência do DNA circulante de EBV (EBV-DNA) em 360 indivíduos residentes em área endêmica para *P. vivax*. Os resultados aqui apresentados demonstraram que 34% dos indivíduos avaliados tiveram o DNA viral amplificado na linha de base do estudo, e destes 22% apresentaram detecção persistente (6 e 12 meses depois) do DNA viral. A frequência de positividade encontrada em nosso estudo está dentro da faixa de positividade descrita para indivíduos adultos e saudáveis, cuja positividade pode ser extremamente variável, com dados variando de 0 a ~70% (GOPAL MR *et al.*, 1990; HAQUE T *et al.*, 1997; IKUTA K *et al.*, 2000; BRENGEL-PESCE K *et al.*, 2002; LING P *et al.*, 2003).

Esta grande variabilidade de positividade, pode ser influenciada por vários fatores, incluindo, entre outros a sazonalidade e nível socioeconômico da área (LING P *et al.*, 2003; KANO F *et al.*, 2012; PIRES C *et al.*, 2018). Além disto, diferenças em protocolos de detecção do vírus podem influenciar nos resultados. De fato, grande

parte dos estudos publicados determinou a presença do EBV através de amostras de DNA provenientes de células B (WILMORE et al, 2015; MOORMANN et al, 2007).

No nosso protocolo, o DNA foi extraído a partir de sangue total, como descrito por outros autores (REYNALDI et al, 2016; PIRIOU et al, 2012). Estas diferenças de protocolo de extração e de procedência da amostra podem influenciar na variabilidade de detecção encontrada na literatura e limitar as comparações entre estudos. Apesar disto, todos os indivíduos categorizados nos subgrupos (PersV_{DNA} ou NegV_{DNA}) foram positivos pela sorologia convencional, o que confirma a alta prevalência de infecção pelo EBV na Amazônia brasileira (TIGUMAN G et al., 2020).

A detecção persistente do DNA viral em um grupo de indivíduos (PersV_{DNA}) permitiu selecionar uma amostra representativa da população de estudo, cujo DNA viral nunca pode ser detectado no sangue circulante (NegV_{DNA}). Embora o pequeno número de amostras aqui caracterizadas por grupo não tenha permitido análises estatísticas mais robustas (multivariada), ambos os grupos foram comparáveis por fatores demográficos, parasitológicos e epidemiológicos. Isto reduziu o risco da influência de fatores de confusão.

6.2 Avaliação do painel de anticorpos de Epstein-Barr vírus

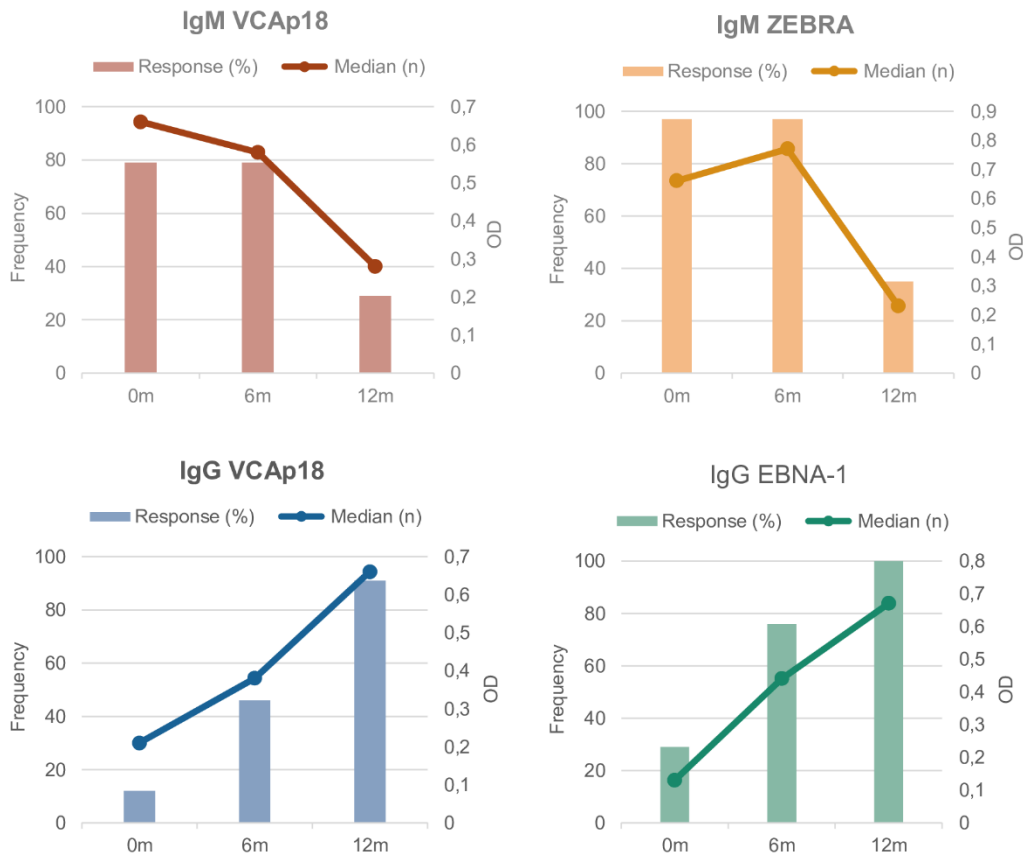
Diferentes técnicas têm sido utilizadas para a detecção de EBV no sangue circulante, incluindo a detecção de anticorpos IgM e IgG contra proteínas do capsídeo viral (VCAs) e antígenos nucleares (EBNAs) (DE PASCHALE & CLERICI, 2012; MORISON et al, 2015), e, mais recentemente, a detecção da proteína ZEBRA (Zta) que está envolvida na replicação viral (HABBIB et al., 2017). Assim, no presente estudo, buscou-se caracterizar o perfil sorológico de EBV nos grupos estudados baseado na presença de anticorpos contra peptídeos sintéticos de EBV (4.4.1).

Do painel de 4 antígenos de EBV, apenas a resposta de IgG ao antígeno lítico VCA-p18 distinguiu os grupos PersV_{DNA} e NegV_{DNA}, em qualquer momento do estudo de acompanhamento. De fato, a avaliação de anticorpos VCA-IgG parece ser o melhor teste para indicar uma infecção passada por EBV (BALFOUR HH., et al, 2015; BAUER G., 2001), considerando que os antígenos do capsídeo viral são associados a altos títulos de IgG persistentes ao longo da vida do indivíduo infectado (LENNETTE, E T., 1995; SCHILLINGER, M et al, 1993).

Curiosamente, no grupo PersV_{DNA}, os anticorpos IgG-VCAp-18 tenderam a estar associados aos anticorpos IgM para antígenos líticos (VCA-p18, EAd-p45/52 e ZEBRA), e isso pode estar associado a fase do ciclo viral em que a infecção se encontra, com a presença de anticorpos IgM e IgG podendo caracterizar uma infecção ativa por reativação viral (DE PASCHALE & CLERICI, 2012; HABBIB et al., 2017). Entretanto, vale ressaltar que nesta população adulta imunocompetente exposta à malária evitou-se o estadiamento da infecção pelo EBV com base na sorologia, já que a manutenção desses anticorpos na circulação depende de vários fatores, incluindo a dinâmica da doença na presença de outras infecções, o que pode conduzir a perfis de anticorpos atípicos (GARTNER et al., 2000; NOWALK & GREEN, 2016). Assim, o perfil sorológico do EBV foi usado aqui como ferramenta complementar para descrever o status sorológico do EBV do grupo PersV_{DNA} versus NegV_{DNA}.

De forma interessante, as respostas de EBV-IgM foram relativamente estáveis durante o período de acompanhamento (em ambos os grupos para todos os antígenos de EBV). Embora as razões para esses achados não sejam claras, hipóteses foram levantadas sobre possíveis reações cruzadas de anticorpos EBV-IgM com outras infecções virais relacionadas antigenicamente (GUERRERO-RAMOS A., et al, 2014; LANG D., et al, 2001; BERTH M., et al, 2009) como citomegalovírus (CMV) que é prevalente na área amazônica (TIGUMAN GMB., et al, 2020). Embora a reação cruzada de IgM não possa ser descartada, estimamos uma alta sensibilidade e especificidade dos peptídeos de EBV usados nos ensaios ELISA. De acordo, em um grupo de 34 crianças da Amazônia (idade média de 9 anos, IQR 8-11) cujas amostras de plasma foram rastreadas para anticorpos anti-EBV usando o mesmo protocolo ELISA baseado em peptídeo (item, 4.4) observamos que os níveis de anticorpos IgM VCA-p18 e IgM ZEBRA diminuíram ao longo do tempo, enquanto IgG VCA-p18 e IgG EBNA-1 aumentaram no mesmo período (12 meses de acompanhamento) e permaneceram positivos durante o período de observação (Figura 28). Esses resultados confirmaram o padrão típico de soroconversão de crianças e adultos imunocompetentes de baixo nível socioeconômico (SMATTI MK, et al., 2018).

Figura 28: Resposta de anticorpos IgM e IgG contra peptídeos do vírus Epstein-Barr em crianças amazônicas ao longo do tempo. Para cada peptídeo EBV (VCA-p18; Zebra, EAd-p45/52 e EBNA-1) a resposta do anticorpo foi representada pela frequência de respondedores (barra) e magnitude da resposta (densidade óptica-OD mediana, linhas). Os resultados representaram três pesquisas transversais realizadas em intervalos de 6 meses, ou seja, na matrícula (0m) e seis (6m) e 12 meses após (12m). Os ensaios ELISA foram realizados conforme descrito nos métodos.



Fonte: elaborado pelo autor.

6.3 Influência do EBV-DNA na resposta de anticorpos contra proteínas de *P. vivax*

Já está bem estabelecido que em áreas hiper e holo-endêmicas de transmissão de malária por *P. falciparum*, a infecção crônica e contínua pelo parasito resulta na reativação do EBV (MOORMANN & BAILEY, 2016). Neste sentido, o presente estudo buscou avaliar se a persistência de DNA viral na circulação de indivíduos com exposição contínua ao *P. vivax* na Amazônia, ainda que em intensidade baixa, poderia influenciar no perfil de anticorpos específicos contra *P. vivax*.

O estudo de acompanhamento de 12 meses permitiu demonstrar, pela primeira vez, que os níveis de anticorpos específicos para *P. vivax* eram em geral mais baixos no grupo PerV_{DNA} em comparação com indivíduos controles sem detecção de DNA viral (NegV_{DNA}). Curiosamente, diferenças mais significativas foram observadas para o novo imunógeno de DBPII, DEKnull-2, que já foi associado a uma resposta de anticorpos neutralizantes (protetores) ampla e de longa duração (KANO FS., et al, 2016; NTUMNGIA FB., et al, 2012). Para DEKnull-2, a diferença na magnitude da resposta de anticorpos entre os grupos PerV_{DNA} e NegV_{DNA} variou de duas a quatro vezes, e essa diferença foi mantida durante todo o período de acompanhamento. De fato, a DEKnull-2 foi desenvolvida para superar o viés de DBPII frente ao desenvolvimento de uma imunidade cepa-específica associada à baixa imunogenicidade (MUELLER I., et al, 2013) e isso pode explicar a diferença na magnitude de resposta de anticorpos, e de frequência de indivíduos respondedores à proteína encontradas entre os grupos estudados.

Nossa abordagem metodológica também incluiu uma variante de DBPII nativa (Sal1) circulando na área amazônica (PIRES CV., et al, 2018). Um perfil de resposta semelhante foi observado para a variante Sal1-DBPII, na qual foi observada menor reatividade no grupo PerV_{DNA}. Em conjunto, os resultados sugeriram que longos episódios de detecção de EBV-DNA podem influenciar nos níveis de resposta imune DBPII cepa-específica e cepa-transcendente. Portanto, pode-se especular que, pelo fato de o EBV infectar células B (WILMORE et al., 2015), a resposta de células B de memória (MBCs) específicas para a DBPII poderia estar comprometida. Para tal, estudos futuros fazem-se necessários para a avaliação de células B de memória DBPII específicas.

Considerando os antígenos mais imunogênicos de fase sanguínea de *P. vivax*, como MSP1-19 (CUNHA MG., et al, 2014) a diferença na magnitude da resposta de anticorpos entre os grupos foi menos pronunciada e observada apenas durante a linha de base (PerV_{DNA} < NegV_{DNA}), quando a transmissão da malária foi mais evidente na área de estudo. Embora as razões para a diferença no perfil de resposta de anticorpos entre os antígenos de *P. vivax* não sejam conhecidas, podemos especular que a variação sazonal local na transmissão da malária pode ter desempenhado um papel, pois os anticorpos contra MSP1-19/AMA-1 podem flutuar consideravelmente de acordo com a transmissão da malária (VICENTIN EC., et al, 2014; YMAN V., et al, 2016; IDRIS ZM., et al, 2017).

De acordo, nosso grupo demonstrou anteriormente que os níveis de MSP1-₁₉/AMA-1 (mas não antígenos específicos de DBPII) caíram quando a transmissão da malária foi reduzida (MEDEIROS CMP., et al, 2020). Considerando que o desenho do nosso estudo envolveu variação temporal no perfil de transmissão da malária (PIRES C et la., 2018), é razoável considerar que os níveis mais baixos desses anticorpos detectados em 6 e 12 meses de acompanhamento (ou seja, no grupo NegV_{DNA}) podem ter mascarado a diferença entre os grupos PerV_{DNA} e NegV_{DNA}. Embora o tamanho de nossa amostra tenha impedido uma análise estatística mais robusta, a mediana para MSP1-₁₉ caiu de 3,7 (na linha de base) para 0,8-1,16 (6 e 12 meses, respectivamente), e para AMA-1 de 2,82 para 1,48-1. Estudos futuros devem levar em consideração uma ampla gama de imunogenicidade entre as proteínas do estágio sanguíneo de *P. vivax*.

6.4 Associação entre os níveis de DNA viral no sangue circulante e resposta de *P. vivax*

Em seguida foi importante verificar se os níveis de DNA circulante influenciavam na resposta de anticorpos para a malária. Para tal, buscou-se utilizar uma técnica sensível para a quantificação do DNA viral. Diferentes técnicas moleculares têm sido desenvolvidas e utilizadas para a detecção e quantificação do DNA de EBV (GULLEY ML, et al., 2008; GATTO F, et al., 2011; NIESTERS HG, et al., 2000; OKANO M, et al., 1988), além da utilização para diagnóstico e monitoramento de infecções primárias, reativação e doenças relacionadas a este vírus (GULLEY ML, et al., 2008; KIMURA H, et al., 2008).

Aqui, utilizamos a técnica de ddPCR (*Droplet Digital PCR*) para quantificar o DNA viral circulante (“DNAmia”) em indivíduos sabidamente persistentes para a detecção do DNA viral por qPCR (item 4.3). Por possuir uma alta sensibilidade e grande praticidade na análise dos resultados, esta técnica tem sido frequentemente utilizada para detecção e quantificação de amostras de DNA, incluindo genoma viral (MUNDO L, et al., 2020; SHUTO T, et al., 2019; KUUSELA E, et al., 2018; VAN HEETVELDE M, et al., 2017). A grande maioria dos indivíduos aqui avaliados

apresentaram números reduzidos de cópias de DNA/ μ L, com medianas variando entre 0.77 e 0.84 durante o período de estudo.

Alguns trabalhos têm demonstrado que níveis elevados de cópias de DNA estão associados a reativação subclínica de EBV, favorecida pelas condições de vida, físicas e ambientais do indivíduo (LI HP, et al., 2003; RICKINSON AB, et al., 1987), condições essas encontradas em áreas com casos de malária aguda (BUDININGSIH I, et al., 2021; HUDNALL SD, et al., 2008). Os indivíduos aqui estudados, tem um histórico de longa exposição à malária e, possivelmente, aos vírus da Amazônia sendo capazes de desenvolver algum grau de proteção clínica não apenas contra a malária (ANTONELLI et al, 2019; BOUSEMA T. et al, 2014), mas também para o EBV (SMATTI MK, et al., 2018), o que poderia então explicar os níveis reduzidos de cópias de DNA observados.

De fato, nos indivíduos estudados não foi encontrada correlação entre os níveis do DNA viral e a resposta de anticorpos anti-*P. vivax*. As razões para este resultado não são conhecidas, podendo-se especular que a longa-exposição ao EBV desde a infância (TIGUMAN GMB., et al, 2020), pode ter levado a uma menor susceptibilidade dos indivíduos a reagudização sintomática e, conseqüente elevação da carga viral. De fato, em áreas com nível socioeconômico mais elevado, as infecções por EBV sintomáticas (mononucleose) acontecem na adolescência (HALLEE TJ et al., 1974; NIEDERMAN JC, 1982; NAUGHTON P et al., 2021). Entretanto, o desenho do estudo não permite conclusão definitiva sobre este tópico.

No entanto, demonstramos aqui uma associação positiva entre anticorpos contra antígenos do capsídeo viral (VCA-p18) e os níveis de DNA viral circulante. De fato, anticorpos IgG contra os VCA's, são encontrados em infecções agudas, convalescentes e passadas (DE PASCHALE M, et al., 2012; HESS RD., 2004; HINDERER W, et al., 1999), e podem persistir durante toda a vida como indicador de exposição ao EBV (DUNMIRE SK, et al., 2015).

7 CONCLUSÃO

- i. A frequência de detecção do DNA de Epstein-Barr vírus (EBV) circulante observada na população estudada encontra-se dentro da faixa de positividade descrita para indivíduos adultos e saudáveis, e foi confirmada pela sorologia convencional.
- ii. Anticorpos IgG contra o antígeno do capsídeo viral (VCA) p-18 de EBV, foram capazes de diferenciar os grupos de indivíduos com e sem DNA viral detectável (PerVDNA e NegVDNA respectivamente). Estes anticorpos demonstraram associação positiva com os níveis de DNA viral circulante e tenderam a uma associação com anticorpos IgM para antígenos líticos;
- iii. O acompanhamento de 12 meses da população de estudo demonstrou que os níveis de anticorpos específicos para proteínas candidatas a vacina contra *P. vivax*, foram em geral mais baixos em indivíduos com DNA viral detectado em comparação com indivíduos controles sem detecção de DNA viral. E de interesse, diferenças mais significativas foram observadas para o novo imunógeno de DBPII, a DEKnull-2;
- iv. Os resultados sugeriram que longos episódios de detecção de EBV-DNA podem influenciar nos níveis de resposta imune DBPII cepa-específica e cepa-transcendente do *P. vivax*;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS JH, *et al.* A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 15, p. 7085-9, Aug 01, 1992. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.15.7085>.
- ADAMS JH *et al.* The Biology of *Plasmodium vivax*. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 3, p. 1–13, 2017. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025585>.
- AKIN F *et al.* Coinfection of *Plasmodium vivax* and Epstein-Barr virus: case report. **Asian Pac J Trop Dis**, v.3, n.1, p. 74–75, 2013.
- ALEXANDRE MA *et al.* Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n.10, 2010. <https://doi.org/10.3201/eid1610.100685>.
- AMANFO SA *et al.* Seroepidemiology of *Plasmodium* species infections in Zimbabwean population. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 267, 10 dez 2016. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1325-3>.
- ANDRADE BB *et al.* Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. **Malaria Journal**, v.9, n.13, 2010. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-13>.
- ANDREI G *et al.* Novel therapeutics for Epstein-Barr virus. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v.24, n.5, p. 997, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24050997>
- ANTONELLI LR *et al.* The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. **Immunological reviews**, v. 293, n.1, p. 163–189, 2020. <https://doi.org/10.1111/imr.12816>.
- ARÉVALO-HERRERA M *et al.* Randomized clinical trial to assess the protective efficacy of a *Plasmodium vivax* CS synthetic vaccine. **Nature communications**, v.13, n.1, p.1603, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29226-3>.
- ASAOLU SO *et al.* The role of health education and sanitation in the control of helminth infections. **Acta tropica**, v. 86, n.2-3, p. 283–294, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(03\)00060-3](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(03)00060-3).
- ASHLEY EA *et al.* Malaria. **Lancet**, v.391, n. 10130, p.1608-1621, 2018 Apr 21. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30324-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30324-6).
- ASNER SA *et al.* Clinical disease severity of respiratory viral co-infection versus single viral infection: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 9, n.6, p. 99392, 2014 Jun 16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099392>.
- BALFOUR HH *et al.* Infectious mononucleosis. **Clinical & translational immunology**, v. 4, n. 2, p. 33, 2015. <https://doi.org/10.1038/cti.2015.1>.

BARGIERI DY *et al.* Adjuvant requirement for successful immunization with recombinant derivatives of Plasmodium vivax merozoite surface protein-1 delivered via the intranasal route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 313–318, 10 maio 2007. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000039>.

BARGIERI DY *et al.* New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin. **Vaccine**, v. 26, n. 48, p. 6132–6142, nov. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.08.070>.

BATCHELOR JD *et al.* Dimerization of Plasmodium vivax DBP is induced upon receptor binding and drives recognition of DARC. **Nature structural & molecular biology**, v.18, n. 8, p. 908–914, 2011. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2088>.

BATTLE KE *et al.* Mapping the global endemicity and clinical burden of Plasmodium vivax, 2000–17: a spatial and temporal modelling study. **The Lancet**, v. 394, n. 10195, p. 332–343, jul. 2019. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31096-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31096-7).

BAUER G. Simplicity through complexity: immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology. **Clin Lab**, v. 47, n. 5–6, p. 223–30, 2001.

BERTH M *et al.* Acute parvovirus B19 infection frequently causes false-positive results in Epstein-Barr virus- and herpes simplex virus-specific immunoglobulin M determinations done on the Liaison platform. **Clin Vaccine Immunol**, v.16, n. 3, p. 372-5, 2009. <https://doi.org/10.1128/CVI.00380-08>.

BHARDWAJ R *et al.* Production of recombinant PvDBP_{II}, receptor binding domain of Plasmodium vivax Duffy binding protein, and evaluation of immunogenicity to identify an adjuvant formulation for vaccine development. **Protein Expression and Purification**, v. 136, p. 52–57, ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.06.011>.

BIGGAR RJ *et al.* Primary Epstein-Barr virus infections in African infants. I. Decline of maternal antibodies and time of infection. **Int J Cancer**, v. 22, n. 3, p. 239–43, 1978. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910220304>.

BLACKMAN MJ *et al.* A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **The Journal of experimental medicine**, v.172, n;1, p. 379–382, 1990. <https://doi.org/10.1084/jem.172.1.379>

BOUILLET, L *et al.* Long-Term Humoral and Cellular Immune Responses Elicited by a Heterologous Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 Protein Prime/Adenovirus Boost Immunization Protocol. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 9, p. 3642–3652, set. 2011. <https://doi.org/10.1128/IAI.05048-11>.

BOUSEMA T *et al.* Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. **Nat Rev Microbiol**, v.12, n. 12, p. 833-40, Dec 2014. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3364>.

BOURGARD C *et al.* *Plasmodium vivax* Biology: Insights Provided by Genomics, Transcriptomics and Proteomics. **Front Cell Infect Microbiol**, v.8, n. 8, p. 34, Feb 2018. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00034>.

BOUSEMA T *et al.* Serologic Markers for Detecting Malaria in Areas of Low Endemicity, Somalia, 2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 392–399, Mar 2010. <https://doi.org/10.3201/eid1603.090732>.

BOUVARD V *et al.* A review of human carcinogens – part B: biological agents. **Lancet Oncol**, v.10, n. 4, p. 321–2, 2009. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70096-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70096-8).

BOYLE MJ *et al.* Human antibodies fix complement to inhibit *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 580-90, Mar 2015. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.012>.

BRASIL P *et al.* Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet Glob Health**. The Lancet. Global health, v.5, n.10, p. e1038–e1046, 2017. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30333-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30333-9).

BRENGEL-PESCE K *et al.* Routine use of real-time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infections. **J Med Virol**, v. 66, n.3, p. 360-9, Mar 2002. <https://doi.org/10.1002/jmv.2153>.

BROOKER S *et al.* Epidemiology of *Plasmodium* helminth co-infection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77. n. 6, p. 88–98, 2007.

CALATTINI S *et al.* Detection of EBV genomes in plasmablasts /plasma cells and non-B cells in the blood of most patients with EBV lymphoproliferative disorders by using Immuno-FISH. **Blood**, v.116, n.22, p. 4546–4559, 2010. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-285452>.

CARBONE A *et al.* HIV associated lymphomas and gamma-herpesviruses. **Blood**, v.113, n.6, p. 1213–1224, 2010. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-180315>.

CARVALHO RCC *et al.* New penta substituted pyrrole hybrid atorvastatin quinoline derivatives with antiplasmodial activity. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 26, n.8, p.1881–1884, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.027>

CEBEY-LÓPEZ M *et al.* Does Viral Co-Infection Influence the Severity of Acute Respiratory Infection in Children? **PLoS One**, v.11, n.4, p. e0152481, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152481>.

CERÁVOLO IP *et al.* Anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 6, p. 675–81, 2005.

CERAVOLO IP *et al.* Inhibitory Properties of the Antibody Response to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein in an Area with Unstable Malaria Transmission. **Scandinavian journal of immunology**, v. 67, n.3, p. 270–278, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2007.02059.x>

CERAVOLO IP *et al.* Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. **Clin Exp Immunol**, v.156, n.3, p. 502-10, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03931.x>.

CERAVOLO I P *et al.* Naturally Acquired Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein (DBP) in Rural Brazilian Amazon. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p. 185–193, 2010. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.08-0580>.

CHAN JA *et al.* Surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v.71, n.19, p. 3633–3657, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1614-3>

CHATTOPADHYAY PK *et al.* A exposição à malária holoendêmica está associada à diferenciação de células T CD8 (+) específica do vírus Epstein-Barr. **J Virol**, v.87, n.3, p.1779–88. <https://doi.org/10.1128/JVI.02158-12>.

CHEN E *et al.* Broadly neutralizing epitopes in the *Plasmodium vivax* vaccine candidate Duffy Binding Protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 22, p. 6277-82, 2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600488113>.

CHEN J *et al.* Development of a time-resolved fluorescence immunoassay for Epstein-Barr virus Zta IgA antibodies in human serum. **Viral Immunol**, v. 28, n.3, p.179-83, 2015. <https://doi.org/doi:10.1089/vim.2014.0126>.

CHENG Q *et al.* Systematic Review of Submicroscopic *P. vivax* Infections: Prevalence and Determining Factors. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n.1, p. e3413, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003413>.

CHENG Y *et al.* The *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 Paralog Is a Novel Erythrocyte-Binding Ligand of *P. vivax*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 5, p. 1585–1595, 2013. <https://doi.org/10.1128/IAI.01117-12>.

CHOOTONG P *et al.* Characterization of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II Immunity: Approach to *Plasmodium vivax* Vaccine Development in Thailand. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35769, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035769>.

COHEN JI *et al.* Epstein-Barr virus: An important vaccine target for cancer prevention. **Sci. Transl. Med**, v.3, n.107fs7, 2011.

COHEN S *et al.* Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**, v.192, p. 733–737. <https://doi.org/10.1038/192733a0>.

COLEY AM *et al.* Structure of the Malaria Antigen AMA1 in Complex with a Growth-Inhibitory Antibody. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 9, p. e138, 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030138>.

COOPER JA. Merozoite surface antigen-I of plasmodium. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 9, n.2, p. 50–54, 1993. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90031-a](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90031-a)

COX-SINGH J *et al.* Plasmodium knowlesi Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 165–171, 15 jan. 2008. <https://doi.org/10.1086/524888>.

CRUZ LAB *et al.* Chronic hepatitis B virus infection drives changes in systemic immune activation profile in patients coinfecting with Plasmodium vivax malaria. **PLoS Negl Trop Dis**, v.13, n.6, p. e0007535, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007535>.

CROMPTON PD *et al.* A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 15, p. 6958-63, 2010.

CROWLEY A *et al.* Is there diagnostic value in detection of immunoglobulin g antibodies to the Epstein-Barr virus early antigen? **Biores Open Access**, v. 1, n.6, p. 291–6, 2012. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0274>.

CUNHA MG *et al.* Serologically defined variations in malaria endemicity in Para state, Brazil. **PLoS One**, v. 9, n.11, p. e113357, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113357>.

DASANNA AK *et al.* Rolling Adhesion of Schizont Stage Malaria-Infected Red Blood Cells in Shear Flow. **Biophysical journal**, v. 112, n.9, p.1908–1919, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.04.001>.

DAWSON GJ *et al.* 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, 2010. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0022>.

DA SILVA-NUNES M *et al.* Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. **Acta Tropica**, v. 121, n. 3, p. 281–291, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.001>.

DE ALVARENGA DAM *et al.* An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. **Scientific reports**, v. 8, n.1, p. 86, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18216-x>.

DE CASTRO AB *et al.* How Immigrant Workers Experience Workplace Problems: A Qualitative Study. **Archives of Environmental & Occupational Health**, v. 61, n. 6, p. 249–258, 2006. <https://doi.org/10.3200/AEOH.61.6.249-258>.

DE PASCHALE M *et al.* Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. **World J Virol**, v.1, n.1, p.31-43, 2012. <https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i1.31>.

DE PINA-COSTA A *et al.* Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.109, n.5, p. 618-33, 2014. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140228>.

DE JONG RM *et al.* Immunity against sexual stage *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites. **Immunol Rev**, v. 293, n.1, p.190-215, 2020. <https://doi.org/10.1111/imr.12828>.

DE S L *et al.* Progress towards the development of a *P. vivax* vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 20, n. 2, p. 97–112, 2021. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1880898>.

DE SOUSA TN *et al.* The duffy binding protein as a key target for a *Plasmodium vivax* vaccine: Lessons from the Brazilian Amazon. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 608–617, 2014. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130592>.

DE SOUSA TN *et al.* Worldwide genetic variability of the duffy binding protein: Insights into *Plasmodium vivax* vaccine development. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–8, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022944>.

DEL PORTILLO HA *et al.* Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 9, p. 4030–4034, 1991. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.4030>.

DEL-TEJO PL *et al.* Should we care about *Plasmodium vivax* and HIV co-infection? A systematic review and a cases series from the Brazilian Amazon. **Malar J**, v. 20, n.1, p.13, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03518-9>.

DIAZ-MUÑOZ SL. Viral coinfection is shaped by host ecology and virus-virus interactions across diverse microbial taxa and environments. **Virus Evol**, v. 3, n.1, p. vex011, 2017. <https://doi.org/10.1093/ve/vex011>.

DOBRESCU I *et al.* Protective Immunity in Mice Immunized With *P. vivax* MSP1-19-Based Formulations and Challenged With *P. berghei* Expressing PvMSP1-19. **Frontiers in immunology**, v.11, n. 28, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00028>.

DRAPER SJ *et al.* Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. **Cell Host & Microbe**, v. 24, n. 1, p. 43–56, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.008>.

DUNMIRE SK *et al.* Infectious mononucleosis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 390, n.1, p. 211–40, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_9.

DUTTA S *et al.* Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 21, p. 12295–12300, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.2032858100>.

EPSTEIN MA *et al.* Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 7335, p. 702–703, 1964. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(64\)91524-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(64)91524-7)

ERIKSON J *et al.* Transcriptional activation of the translocated c-myc oncogene in Burkitt Lymphoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 3, p. 820–824, 1983. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.3.820>.

FACHIROH J *et al.* Single-assay combination of Epstein-Barr Virus (EBV) EBNA1- and viral capsid antigen-p18-derived synthetic peptides for measuring anti-EBV immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody levels in sera from nasopharyngeal carcinoma patients: options for field screening. **J Clin Microbiol**, v. 44, n.4, p.1459-67, 2006. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1459-1467.2006>.

FERNANDEZ-BECERRA C *et al.* Naturally-acquired humoral immune responses against the N- and C-termini of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 29, 2010. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-29>.

FERREIRA MU *et al.* Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal**, v.15, n.1, p. 284,2016. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1335-1>

FERREIRA M U *et al.* Malaria Situation in Latin America and the Caribbean: Residual and Resurgent Transmission and Challenges for Control and Elimination. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), p. 57–70, 2013. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9550-9_4.

FOWKES FJ *et al.* New Insights into Acquisition, Boosting, and Longevity of Immunity to Malaria in Pregnant Women. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 10, p. 1612–1621, 2012. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis566>.

FOWKES FJ, *et al.* Immunity to malaria in an era of Declining malaria transmission. **Parasitology**, v.143, n.2, p.139-53,2016. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001249>.

FRANÇA-DIAS MH. Influência da infecção pelo Epstein-Barr vírus na malária humana causada por *Plasmodium vivax*. 2018. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34568>

FREEMAN R. *Ret al.* Surface antigens of malaria merozoites. A high molecular weight precursor is processed to an 83,000 mol wt form expressed on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites. **The Journal of experimental medicine**, v.158, n. 5, p. 1647–1653, 1983. <https://doi.org/10.1084/jem.158.5.1647>.

FRISCHKNECHT Fet *al.* Experimental systems for studying Plasmodium/HIV coinfection. **FEBS letters**, v. 590, n. 13, p. 2000–2013, 2016. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12151>.

GARTNER BC *et al.* No correlation in Epstein-Barr virus reactivation between serological parameters and viral load. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n.6, p. 2458, 2020. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.6.2458-2458.2000>.

GILLES HM. Essential Malariology. 2nd. **Hodder Education Publishers**, 1985.

GILBERGER TW *et al.* A Novel Erythrocyte Binding Antigen-175 Parologue from *Plasmodium falciparum* Defines a New Trypsin-resistant Receptor on Human Erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 16, p. 14480–14486, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211446200>.

GENTIL F *et al.* A recombinant vaccine based on domain II of Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice. **Vaccine**, v. 28, n. 38, p. 6183–6190, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.017>.

GENTON B *et al.* *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: A prospective cohort study from Papua New Guinea. **PLoS medicine**, v.5, n.6, p. e127, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050127>.

GETIE S *et al.* Prevalence and clinical correlates of Schistosoma mansoni co-infection among malaria infected patients, Northwest Ethiopia. **BMC research notes**, v.8, p.480. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1468-2>.

GHANI AC *et al.* Loss of population levels of immunity to malaria as a result of exposure-reducing interventions: consequences for interpretation of disease trends. **PloS one**, v.4, n.2, p. e4383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004383>.

GONCALVES RM *et al.* Parasite virulence, co-infections and cytokine balance in malaria. **Pathog Glob Health**, v. 108, n.4, p.173-8, 2014. <https://doi.org/10.1179/2047773214Y.0000000139>.

GOPAL MR *et al.* Detection by PCR of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx of healthy adults and HIV-seropositives. **Lancet**, v. 30, n. 335, p.1598-9, 1990. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91433-b](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91433-b).

GREENWOOD BM *et al.* Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1266–76, 2008. <https://doi.org/10.1172/JCI33996>.

GUERRA CA *et al.* Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 8, p. 353–358, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.06.006>.

GUERRERO-RAMOS A *et al.* Performance of the architect EBV antibody panel for determination of Epstein-Barr virus infection stage in immunocompetent adolescents and young adults with clinical suspicion of infectious mononucleosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 21, n. 6, p. 817-23, 2014. <https://doi.org/10.1128/0162-1469.00754-13>.

GUTTERY DS *et al.* A unique protein phosphatase with kelch-like domains (PPKL) in *Plasmodium* modulates ookinete differentiation, motility and invasion. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 9, p. e1002948, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002948>.

HABIB M *et al.* Lytic EBV infection investigated by detection of Soluble Epstein-Barr virus ZEBRA in the serum of patients with PTLD. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 10479, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09798-7>

HAQUE T *et al.* PCR amplification is more sensitive than tissue culture methods for Epstein-Barr virus detection in clinical material. **The Journal of general virology**, v.78, Pt 12, p. 3357–3360. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-12-3357>.

HE W *et al.* Antibody responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding and Erythrocyte binding proteins predict risk of infection and are associated with protection from clinical Malaria. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0006987, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006987>.

HEALER J *et al.* Independent Translocation of Two Micronemal Proteins in Developing *Plasmodium falciparum* Merozoites. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5751–5758, 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5751-5758.2002>.

HESS RD. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n.8, p. 3381–3387, 2004. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3381-3387.2004>

HALLEE TJ *et al.* Infectious mononucleosis at the United States Military Academy. A prospective study of a single class over four years. **Yale J Biol Med**, v.47, n.3, p.182–95, 1974.

HILL DL *et al.* Opsonising antibodies to *P. falciparum* merozoites associated with immunity to clinical malaria. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74627, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074627>.

HINDERER W *et al.* Serodiagnosis of Epstein-Barr virus infection by using recombinant viral capsid antigen fragments and autologous gene fusion. **J Clin Microbiol**, v. 37, n.10, p.3239–44, 1999. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.10.3239-3244.1999>.

HODDER AN *et al.* The Disulfide Bond Structure of *Plasmodium* Apical Membrane Antigen-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 46, p. 29446–29452, 1996. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.29446>.

HOWARD SC *et al.* Methods for estimation of associations between multiple species parasite infections. **Parasitology**, v.122, Pt 2, p. 233–51, 2001. <https://doi.org/10.1017/s0031182001007272>.

IDRIS ZM *et al.* Naturally acquired antibody response to *Plasmodium falciparum* describes heterogeneity in transmission on islands in Lake Victoria. **Sci Rep**, v.7, n.1, p. 9123, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09585-4>.

IKUTA K *et al.* Detection of Epstein-Barr virus in salivas and throat washings in healthy adults and children. **Microbes Infect**, v.2, n.2, p.115-20, 2000. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00277-x](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00277-x).

KADEKOPPALA M *et al.* Merozoite surface proteins of the malaria parasite: The MSP1 complex and the MSP7 family. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 10, p. 1155–1161,2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.04.008>.

KANO FS *et al.* *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. **Tropical Medicine & International Health**, v. 17, n. 8, p. 989–1000, ago. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2012.03016.x>.

KANO FS *et al.* The Presence, Persistence and Functional Properties of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. **PLoS neglected tropical diseases**, v.10, n.12, p. e0005177, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005177>

KEVIN BJ. Evidence, and implications of mortality associated with acute plasmodium vivax malaria. **Clinical microbiology reviews**, v.26, n.1, p. 36–57, 2013. <https://doi.org/10.1128/CMR.00074-12>

KHO WG *et al.* Analysis of polymorphic regions of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein of Korean isolates. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 39, n. 2, p. 143, 2001. <https://doi.org/10.3347/kjp.2001.39.2.143>.

KING CL *et al.* Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. **Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n.24, p. 8363–8368, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800371105>.

KINUNG'HI SM *et al.* Malaria and Helminth Co-Infections in School and Preschool Children: A Cross-Sectional Study in Magu District, North-Western Tanzania. **PLoS ONE**, v.9, n.1, p. e86510, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086510>.

KLUTTS JS *et al.* Evidence-based approach for interpretation of Epstein-Barr virus serological patterns. **J Clin Microbiol**, v.47, n.10, p. 3204–10, 2009. <https://doi.org/10.1128/JCM.00164-09>.

KOCKEN CHM *et al.* Molecular characterisation of *Plasmodium reichenowi* apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with *P. falciparum* AMA-1, and antibody-mediated inhibition of red cell invasion. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 109, n. 2, p. 147–156, jul. 2000. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(00\)00250-4](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(00)00250-4).

KOEPFLI C *et al.* A high force of plasmodium vivax blood-stage infection drives the rapid acquisition of immunity in papua new guinean children. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 9, p. e2403, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002403>.

KOUSSIS K *et al.* A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 6, p. 725–735, 18 mar. 2009. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.22>

KUMAR N *et al.* Virological and immunological outcomes of coinfections. **Clin Microbiol Ver**, v. 31, p. e00111-17, 2018. <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-17>.

LACERDA MV *et al.* Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria Journal**, v.11, n.12, 2012. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-12>.

LANG D *et al.* Cross-reactivity of Epstein-Barr virus-specific immunoglobulin M antibodies with cytomegalovirus antigens containing glycine homopolymers. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.8, n.4, p. 747-56, 2001. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.4.747-756.2001>

LANGHORNE J *et al.* Immunity to malaria: more questions than answers. **Nat Immunol**, v. 9, n. 7, p. 725-32, Jul 2008. <https://doi.org/10.1038/ni.f.205>.

LAURENS MB *et al.* The Promise of a Malaria Vaccine—Are We Closer? **Annual Review of Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 273–292, 8 set. 2018. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062427>.

LENNETTE ET *et al.* Epstein-Barr virus (EBV), p. 299-312, 995.

LIM SS *et al.* Development of Inhibitors of Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 Based on Fragment Screening. **Australian Journal of Chemistry**, v. 66, n. 12, p. 1530, 2013. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800802>

LIMA LC *et al.* A Multistage Formulation Based on Full-Length CSP and AMA-1 Ectodomain of Plasmodium vivax Induces High Antibody Titers and T-cells and Partially Protects Mice Challenged with a Transgenic Plasmodium berghei Parasite. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 916, 17 jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060916>.

LIMA-JUNIOR JC *et al.* Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 Alleles on IgG Antibody Response to the *P. vivax* MSP-1, MSP-3 α and MSP-9 in Individuals from Brazilian Endemic Area. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36419, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036419>.

LING PD *et al.* The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults: a 14-month longitudinal study. **J Infect Dis**, v. 187, n.10, p.1571-80, 2003. <https://doi.org/10.1086/374739>.

LOMBARDI L *et al.* Pathogenesis of Burkitt lymphoma: expression of an activated c-myc oncogene causes the tumorigenic conversion of EBV-infected human B lymphoblasts. **Cell**, v. 49, n. 2, p. 161–170, 1987. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90556-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90556-3).

LONGLEY RJ *et al.* Development and validation of serological markers for detecting recent Plasmodium vivax infection. **Nature Medicine**, v. 26, n. 5, p. 741–749, 11 maio 2020. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0841-4>.

LORENZ C *et al.* Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. **Malaria journal**, v.14, n. 408, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0934-6>

MAGALHAES BM *et al.* Clinical profile of concurrent dengue fever and *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon: case series of 11 hospitalized patients. **Am J Trop Med Hyg**, v. 87, n.6, p.1119-24, 2012. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0210>

MAGRATH I. Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma. **Br. J. Haematol**, v.156, n. 6, p. 744-56, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.09013.x>.

MARQUES AC. Migration and dissemination of malaria in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p.17-30, 1986. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761986000600004>.

MARSH K *et al.* Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunol**, v. 28, n. 1-2, p. 51-60, Jan-Feb 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00808.x>.

MASAKHWE C *et al.* Frequency of Epstein – Barr Virus in patients presenting with acute febrile illness in Kenya. **Plos One**, v. 11, n. 5, p. e0155308, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155308>.

MATAR CG *et al.* Does EBV alter the pathogenesis of malaria? **Parasite Immunology**, v. 37, n. 9, p. 433-45, 2015. <https://doi.org/10.1111/pim.12212>.

MAYER DCG *et al.* Characterization of a *Plasmodium falciparum* erythrocyte-binding protein paralogous to EBA-175. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 9, p. 5222–5227, 24 abr. 2001. <https://doi.org/10.1073/pnas.081075398>.

MBALE EW *et al.* HIV coinfection influences the inflammatory response but not the outcome of cerebral malaria in Malawian children. **J Infect**, v. 73, n. 3, p. 189-99, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.05.012>.

MEDEIROS CMP *et al.* Dynamics of IgM and IgG responses to the next generation of engineered Duffy binding protein II immunogen: Strain-specific and strain-transcending immune responses over a nine-year period. **PLoS One**, v. 15, n. 5, p. e0232786, 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0232786.

MEIS JF *et al.* A scanning electron microscopic study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*. **Acta tropica**, v. 50, n. 3, p.227-36, 1992. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(92\)90079-d](https://doi.org/10.1016/0001-706x(92)90079-d).

MICHON P *et al.* Naturally Acquired and Vaccine-Elicited Antibodies Block Erythrocyte Cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3164–3171, 1 jun. 2000. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3164-3171.2000>.

MILLER G *et al.* Lytic cycle switches of oncogenic human gammaherpesviruses. **Adv Cancer Res**, v. 97, p.81-109, 2007. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(06\)97004-3](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(06)97004-3).

MOLYNEUX EM *et al.* Burkitt's lymphoma. **Lancet**, v. 379, p. 1234–44, 2012. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61177-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61177-X).

MOORMANN AM *et al.* Exposure to holoendemic malaria results in elevated Epstein-Barr virus loads in children. **J Infected Dis**, v. 191, p. 1233-874, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(06\)97004-3](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(06)97004-3).

MOORMANN AM *et al.* The company malaria keeps: how co-infection with Epstein – Barr virus leads to endemic Burkitt lymphoma. **Curr Opin Infect Dis**, v. 24, p.435-41, 2011. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(06\)97004-3](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(06)97004-3).

MOORMANN AM *et al.* Malaria — how this parasitic infection aids and abets EBV-associated Burkitt lymphomagenesis. **Current Opinion in Virology**, v. 20, p.78–84, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.09.006>.

MOHANDAS N *et al.* Malaria and Human Red Blood Cells. **Med Microbiol Immunol**, v. 201, n. 4, p. 593–598, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00430-012-0272-z>.

MORAIS CG *et al.* Antibodies to *Plasmodium Vivax* Apical Membrane Antigen 1: Persistence and correlation with malaria transmission intensity. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 4, p. 582–587, 1 out. 2006.

MOTEVALLI HAGHI A *et al.* A Recombinant *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen-1 to Detect Human Infection in Iran. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 50, n. 1, p. 15–21, 6 mar. 2012. <https://doi.org/10.3347/kjp.2012.50.1.15>.

MUELLER I *et al.* Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. **Adv Parasitol**, v. 81, p. 77-131, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407826-0.00003-5>.

MÚFALO BC *et al.* *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 12–13, p. 1266–1273, out. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.023>.

MURAMATSU M *et al.* Class switch recombination and hypermutation require activation induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. **Cell**, v. 102, p. 553-563, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00078-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00078-7).

MURATA T *et al.* Switching of EBV cycles between latent and lytic states. **Rev.Med.Virol**, v. 24, p, 42-153, 2014. <https://doi.org/10.1002/rmv.1780>

MURUNGI LM *et al.* Serological Profiling for Malaria Surveillance Using a Standard ELISA Protocol. **Methods Mol Biol**, v. 2013, p. 83-90. 2019. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9550-9_6.

NAIR M *et al.* Structure of Domain III of the Blood-stage Malaria Vaccine Candidate, *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 (AMA1). **Journal of Molecular Biology**, v. 322, n. 4, p. 741–753, set. 2002. <https://doi.org/10.1016/s0022->

2836(02)00806-9.

NAUGHTON P *et al.* Infectious Mononucleosis: diagnosis and clinical interpretation. **Br J Biomed Sci**, v. 78, n.3, p. 107-116, 2021. <https://doi.org/10.1080/09674845.2021.1903683>.

NICOLETE VC *et al.* Naturally Acquired Binding-Inhibitory Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein and Clinical Immunity to Malaria in Rural Amazonians. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 10, p. 1539–1546, 15 nov. 2016. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw407>.

NIEDERMAN JC. Infectious mononucleosis: observations on transmission. **Yale J Biol Med**, v. 55, n. 3-4, p. 259-64, 1982.

NJAU MN *et al.* The enigma of memory B cells in malaria. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 12, p. 3146-9, 2012. <https://doi.org/10.1002/eji.201243056>.

NOWALK A *et al.* Epstein-Barr virus. **Microbiol Spectrum**, v. 4, n. 3, 2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0011-2015>.

NTUMNGIA FB *et al.* Design and Immunogenicity of a Novel Synthetic Antigen Based on the Ligand Domain of the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 1, p. 30–36, jan. 2012. <https://doi.org/10.1128/CVI.05466-11>.

NTUMNGIA FB *et al.* An engineered vaccine of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein enhances induction of broadly neutralizing antibodies. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 13779, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13891-2>.

NTUMNGIA FB *et al.* Structural Analysis of the Synthetic Duffy Binding Protein (DBP) Antigen DEKnull Relevant for *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Design. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003644, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003644>.

NTUMNGIA FB *et al.* A Novel Erythrocyte Binding Protein of *Plasmodium vivax* Suggests an Alternate Invasion Pathway into Duffy-Positive Reticulocytes. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 1–5, 7 set. 2016. <https://doi.org/10.1128/mBio.01261-16>.

O'DONNELL RA *et al.* Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. **J Exp Med**, v. 193, n. 12, p. 1403-12, Jun 18, 2001. <https://doi.org/10.1084/jem.193.12.1403>.

OLIVEIRA-FERREIRA J *et al.* Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 115, 2010. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-115>.

OLWENY CL. Etiology of endemic Burkitt's lymphoma. **IARC Sci Publ**, v.63, p. 647-53, 1984. PMID: 6100285.

ONG CWM *et al.* Monkey Malaria in Humans: A Diagnostic Dilemma with Conflicting Laboratory Data. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 6, p. 927–928, 1 jun. 2009. PMID: 19478250.

PATOUILLARD E *et al.* Global investment targets for malaria control and elimination between 2016 and 2030. **BMJ Glob Health**, v. 2, n. 2, p. e000176. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2016-000176>.

PARWEEN S *et al.* Induction of humoral immune response against PfMSP-119 and PvMSP-119 using gold nanoparticles along with alum. **Vaccine**, v. 29, n. 13, p. 2451–2460, 16 mar. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.014>.

PETERSEN-MAHRT SK *et al.* AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. **Nature**, v. 418, p. 99-103, 2002. <https://doi.org/10.1038/nature00862>.

PHIMPRAPHI W *et al.* Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in a Karen population in Thailand. **Malaria Journal**, v. 7, p. 99, Jun 02, 2008. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-99>.

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

PIRIOU E *et al.* Early age at time of primary Epstein- Barr virus infection results in poorly controlled viral infection in infants from Western Kenya: clues to the etiology of endemic Burkitt lymphoma. **J Infect Dis**, v. 205, p. 906–13, 2012. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir872>.

PRIEST JW *et al.* Integration of Multiplex Bead Assays for Parasitic Diseases into a National, Population-Based Serosurvey of Women 15-39 Years of Age in Cambodia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004699, 3 maio 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004699>.

PRIEST JW *et al.* Specificity of the IgG antibody response to *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium ovale* MSP1-19 subunit proteins in multiplexed serologic assays. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 417, 9 dez. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2566-0>.

QUADT KA *et al.* The Density of Knobs on *Plasmodium falciparum* –Infected Erythrocytes Depends on Developmental Age and varies among Isolates. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e45658, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045658>

QUINTANA MDP *et al.* Endemic Burkitt lymphoma - an aggressive childhood cancer linked to *Plasmodium falciparum* exposure, but not to exposure to other malaria parasites. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 128, n. 2, p. 129–135, 2020. <https://doi.org/10.1111/apm.13018>

QUEIROGA EM *et al.* Burkitt lymphoma in Brazil is characterized by geographically distinct clinicopathologic features. **American journal of clinical pathology**, v. 130, n.6, p. 946–956, 2008. <https://doi.org/10.1309/AJCP64YOHAWLUMPK>

RANJAN A *et al.* Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding

proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 24, p. 14067–14072, 23 nov. 1999. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.14067>

RATTANAPUNYA S *et al.* Prevalence of malaria and HIV coinfection and influence of HIV infection on malaria disease severity in population residing in malaria endemic area along the Thai-Myanmar border. **Acta tropica**, v. 145, p. 55-60, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.001>.

REVY P *et al.* Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). **Cell**, v. 102, n. 5, p. 565–575. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00079-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00079-9)

REYNALDI A *et al.* Impact of *Plasmodium falciparum* coinfection on longitudinal Epstein – Barr Virus kinetics in kenyan children. **The Journal of infectious diseases**, v. 213, n. 6, p. 985–991. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv525>

RICKINSON AB. Co-infections, inflammation, and oncogenesis: Future directions for EBV research. **Seminars in cancer biology**, v. 26, p. 99–115, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.004>

ROBBIANI DF *et al.* Plasmodium Infection Promotes Genomic Instability and AID-Dependent B Cell Lymphoma. **Cell**, v. 162, n. 4, p. 727-37, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.019>.

RODRIGUES MHC *et al.* Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. **Malaria Journal**, v. 2, n. 1, p. 39, 14 dez. 2003. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-2-39>

SALAVATIFAR M *et al.* Evaluation of Naturally Acquired Antibody Responses to Two Variant Forms of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen-1 in Individuals Living in Areas of Low and Unstable Malaria Transmission of Iran. **Archives of Iranian medicine**, v. 18, n. 12, p. 834–43, dez. 2015.

SCHERF A *et al.* Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. **Annual review of microbiology**, v. 62, p. 445–470. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093134>

SCOTTA MC *et al.* Respiratory viral coinfection and disease severity in children: A systematic review and meta-analysis. **J Clin Virol**, n. 80, p. 45-56, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.04.019>.

SECRETARIA DE VIGILANCIA A SAUDE (SVS). Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malaria (PNCM), Departamento de Doenças Transmissíveis, **Ministério da Saúde**, 2017.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). **Ministério da Saúde (MS)**. Boletim Epidemiológico da malária no Brasil, 2021.

SETH RK *et al.* Acquired immune response to defined *Plasmodium vivax* antigens in individuals residing in northern India. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 3, p. 199–206, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.12.006>

SHANKARKUMAR U *et al.* HIV and malaria coinfection in Mumbai, western India. **Journal of vector borne diseases**, v. 48, n. 3, p. 155–158.

SILVIE O *et al.* A Role for Apical Membrane Antigen 1 during Invasion of Hepatocytes by *Plasmodium falciparum* Sporozoites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 10, p. 9490–9496, 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311331200>.

SIMONE O *et al.* Imuno-receptores inatos de TLRs e proteína 1 da membrana eritrocitária de *Plasmodium falciparum* (PfEMP1) ativação da célula B policlonal humana controlada por CIDR1 alfa. **Acta Trop**, v. 119, n. 2–3, p. 144–50, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.05.005>.

SINGH SK *et al.* Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. **Biochemical Journal**, v. 374, n. 1, p. 193–198, 2003. <https://doi.org/10.1042/BJ20030622>

SINGH K *et al.* Malaria vaccine candidate based on Duffy-binding protein elicits strain transcending functional antibodies in a Phase I trial. **NPJ vaccines**, v. 3, n. 48. <https://doi.org/10.1038/s41541-018-0083-3>.

SIQUEIRA AM *et al.* *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 87-96, 2016. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0204>.

SMATTI MK *et al.* Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. **Front Oncol**, v. 8, p. 211, 2018. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00211>.

SMETS F *et al.* Characteristics of Epstein-Barr virus primary infection in pediatric liver transplant recipients. **Journal of hepatology**, v. 32, n. 1, p. 100–104, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(00\)80195-6](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(00)80195-6)

SNOW RW *et al.* The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, n. 7030, p. 214–217, 2005. <https://doi.org/10.1038/nature03342>

SOARES IS *et al.* A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. **Molecular medicine** (Cambridge, Mass.), v. 5, n. 7, p. 459–70, 1 jul. 1999.

SOARES IS *et al.* 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. 1606–14, maio 1997. <https://doi.org/10.1128/iai.65.5.1606-1614.1997>

SOUSA TN *et al.* The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area.

Molecular and Biochemical Parasitology, v. 146, n. 2, p. 251–254, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.11.006>

SOUSA TN *et al.* Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in brazilian *Plasmodium vivax* populations. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 334, 2010. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-334>.

SOUZA JM *et al.* 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, 1999. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.357>.

SOUZA-SILVA F A *et al.* Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) Polymorphisms and Its Involvement in Acquisition of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II (DBPII) Immunity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93782, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093782>

SUPALI T *et al.* Polyparasitism and its impact on the immune system. **International journal for parasitology**, v. 40, n.10, p. 1171–1176, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.05.003>

SURENDRA H *et al.* Analysis of serological data to investigate heterogeneity of malaria transmission: a community-based cross-sectional study in an area conducting elimination in Indonesia. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 227, 8 dez. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2866-z>.

TAKALA SL *et al.* Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 9, p. 560-73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01138.x>.

TAVARES J *et al.* Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 5, p. 905–915, 2013. <https://doi.org/10.1084/jem.20121130>.

TAY SC *et al.* The prevalence of malaria among HIV seropositive individuals and the impact of the co- infection on their hemoglobin levels. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 14, n.10, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0064-6>.

THAM WH *et al.* *Plasmodium vivax* vaccine research – we've only just begun. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 2–3, p. 111–118, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.09.006>.

TIGUMAN GMB *et al.* Seroprevalence of cytomegalovirus and its coinfection with Epstein-Barr virus in adult residents from Manaus: a population-based study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. e20190363. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0363-2019>

TRIGLIA T *et al.* Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by Plasmodium species. **Molecular Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 706–718, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02175.x>.

- TROTTIER H *et al.* Transfusion-related Epstein-Barr virus infection among stem cell transplant recipients: a retrospective cohort study in children. **Transfusion**, v. 52, n. 12, p. 2653-63, 2012 <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03611.x>.
- TSUBOI T *et al.* Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 12, p. 5581–5586, 1994. <https://doi.org/10.1128/iai.62.12.5581-5586.1994>.
- TWOHIG KA *et al.* Growing evidence of *Plasmodium vivax* across malaria endemic Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007140>.
- VANBUSKIRK KM *et al.* Antigenic Drift in the Ligand Domain of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein Confers Resistance to Inhibitory Antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 9, p. 1556–1562, 2004. <https://doi.org/10.1086/424852>.
- VAUMOURIN E *et al.* The importance of multiparasitism: examining the consequences of co-infections for human and animal health. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 545, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1167-9>.
- VICENTIN C *et al.* Invasion-Inhibitory Antibodies Elicited by Immunization with *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen-1 Expressed in *Pichia pastoris* Yeast. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1296–1307, 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01169-13>.
- VITORINO RR *et al.* Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2011000300015>.
- WEISS GE *et al.* The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 5, p. e1000912, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000912>.
- WHITE NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v. 10, p. 297, 2011. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-297>
- WHO. **World malaria report**. World Health Organization, 2017.
- WHO. **World malaria report**. World Health Organization, 2019.
- WHO. **World malaria report**. World Health Organization, 2020.
- WHO. **World malaria report**. World Health Organization, 2021.
- WHO/GMP. **Global Malaria Program - The potential impact of health service disruptions on the burden of malaria. A modelling analysis for countries in sub-Saharan Africa**. World Health Organization, 2020.

WHO/GTS. **World Malaria Report - Global technical strategy for malaria 2016-2030**. World Health Organization, 2015.

WICKRAMARACHCHI T *et al.* Natural Human Antibody Responses to Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 under Low Transmission and Unstable Malaria Conditions in Sri Lanka. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 798–801, jan. 2006. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.798-801.2006>.

WILMORE JR *et al.* AID expression in peripheral blood of children living in amalaria holoendemic region is associated with changes in B cell subsets and Epstein-Barr virus. **Int J Cancer**, v. 136, n. 6, p. 1371-80, 2015. <https://doi.org/10.1002/ijc.29127>.

YANG C *et al.* Partial Protection against Plasmodium vivax Blood-Stage Infection in Saimiri Monkeys by Immunization with a Recombinant C-Terminal Fragment of Merozoite Surface Protein 1 in Block Copolymer Adjuvant. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 342–349, 1999. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.1.342-349.1999>.

YILDIZ ZEYREK F *et al.* Serologic Markers in Relation to Parasite Exposure History Help to Estimate Transmission Dynamics of *Plasmodium vivax*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e28126, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028126>.

YMAN V *et al.* Antibody acquisition models: A new tool for serological surveillance of malaria transmission intensity. **Sci Rep**, v. 6, p.19472, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep19472>.

YOUNG L *et al.* Epstein-Barr virus: 40 years on. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n.10, p. 757–768, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrc1452>.

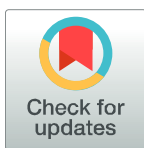
RESEARCH ARTICLE

Impact of Epstein-Barr virus co-infection on natural acquired *Plasmodium vivax* antibody response

Michelle H. F. Dias¹, Luiz F. F. Guimarães¹, Matheus G. Barcelos¹, Eduardo U. M. Moreira¹, Maria F. A. do Nascimento¹, Tais N. de Souza¹, Camilla V. Pires², Talita A. F. Monteiro³, Jaap M. Middeldorp⁴, Irene S. Soares⁵, Cor J. F. Fontes⁶, Francis B. Ntumngia², John H. Adams², Flora S. Kano¹, Luzia H. Carvalho^{1*}

1 Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **2** Center for Global Health and Infectious Diseases Research, Department of Global Health, College of Public Health, University of South Florida, Tampa, Florida, United States of America, **3** Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde (IEC/SVS/MS), Belém, Pará, Brazil, **4** Department of Pathology, Free University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands, **5** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil, **6** Julio Müller School Hospital, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil

* luzia.carvalho@fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: Dias MHF, Guimarães LFF, Barcelos MG, Moreira EUM, do Nascimento MFA, de Souza TN, et al. (2022) Impact of Epstein-Barr virus co-infection on natural acquired *Plasmodium vivax* antibody response. PLoS Negl Trop Dis 16(8): e0010305. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010305>

Editor: Donnelly Andrew van Schalkwyk, London School of Hygiene and Tropical Medicine Faculty of Infectious and Tropical Diseases, UNITED KINGDOM

Received: March 4, 2022

Accepted: July 22, 2022

Published: August 3, 2022

Copyright: © 2022 Dias et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (422257/2016-8 by LHC); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG (Universal APQ 01580-18);

Abstract

Background

The simultaneous infection of *Plasmodium falciparum* and Epstein-Barr virus (EBV) could promote the development of the aggressive endemic Burkitt's Lymphoma (eBL) in children living in *P. falciparum* holoendemic areas. While it is well-established that eBL is not related to other human malaria parasites, the impact of EBV infection on the generation of human malaria immunity remains largely unexplored. Considering that this highly prevalent herpesvirus establishes a lifelong persistent infection on B-cells with possible influence on malaria immunity, we hypothesized that EBV co-infection could have impact on the naturally acquired antibody responses to *P. vivax*, the most widespread human malaria parasite.

Methodology/Principal findings

The study design involved three cross-sectional surveys at six-month intervals (baseline, 6 and 12 months) among long-term *P. vivax* exposed individuals living in the Amazon rainforest. The approach focused on a group of malaria-exposed individuals whose EBV-DNA (amplification of *bafl-5* gene) was persistently detected in the peripheral blood (PersV_{DNA}, n = 27), and an age-matched malaria-exposed group whose EBV-DNA could never be detected during the follow-up (NegV_{DNA}, n = 29). During the follow-up period, the serological detection of EBV antibodies to lytic/latent viral antigens showed that IgG antibodies to viral capsid antigen (VCA-p18) were significantly different between groups (PersV_{DNA} > NegV_{DNA}). A panel of blood-stage *P. vivax* antigens covering a wide range of immunogenicity confirmed that in general PersV_{DNA} group showed low levels of antibodies as compared with NegV_{DNA}. Interestingly, more significant differences were observed to a novel DBPII

Fundação Oswaldo Cruz (INOVA-FIOCRUZ 007-FIO-18-2-33 by FSK); National Institute of Health - NIH (Grant R01AI064478 by JHA). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

immunogen, named DEKnull-2, which has been associated with long-term neutralizing antibody response. Differences between groups were less pronounced with blood-stage antigens (such as MSP1-19) whose levels can fluctuate according to malaria transmission.

Conclusions/Significance

In a proof-of-concept study we provide evidence that a persistent detection of EBV-DNA in peripheral blood of adults in a *P. vivax* semi-immune population may impact the long-term immune response to major malaria vaccine candidates.

Author summary

In the Amazon rainforest, both *Plasmodium vivax* and Epstein-Barr virus (EBV) infections are common, yet the Burkitt's lymphoma (BL) is rare, despite an association between endemic BL with chronic *P. falciparum* exposure. Nevertheless, the influence of EBV infection on malaria immunity remains undetermined. Here, we investigated for the first time whether continuous detection of EBV-DNA in the peripheral blood of adults exposed to *P. vivax* could impact the antibody response to blood-stage malaria vaccine candidates. The methodological approach involved 12-month follow-up among *P. vivax*-exposed Amazonian classified as persistent EBV-DNA carriers (PersV_{DNA}) and an age-matched group with no viral DNA detection (NegV_{DNA}); groups were further differentiated based on profile of viral antibodies (mainly IgG VCA-p18). Collectively, our findings demonstrated that antibody levels against *P. vivax* antigens were in general lower in the PersV_{DNA} group as compared with NegV_{DNA}. More significant differences were observed to a novel vaccine candidate (DEKnull-2) whose antibody response were previously associated with broadly neutralizing *P. vivax* antibodies. Differences between groups were less pronounced with *P. vivax* antigens associated with seasonal changes in the antibody responses. In this conceptual study, we provide evidence that long-term detection of EBV in peripheral blood may impact immune response to major malaria vaccine candidates.

Introduction

The impact of malaria infection is greater on populations living in the poorest regions of the globe, where sanitary conditions are precarious, leaving the population subject to possible co-infections with other infectious agents, including parasites [1,2], bacteria [3,4] and viruses [5,6]. Consequently, in malaria endemic areas, the simultaneous infection with multiple pathogens has implications for understanding the development of protective immunity as well as the efficacy of antimalarial vaccines [7,8]. Common co-infections include herpes viruses as most vertebrates are infected with one or more types that remain for the rest of their lives [9].

The severe consequence of co-infection involving holoendemic *Plasmodium falciparum* and the Epstein-Barr virus (EBV)—a gammaherpes virus that infects B cells and maintains latency throughout the individuals' lifetime [10,11]—is well established, as the interaction could promote the development of endemic Burkitt's Lymphoma (eBL) [12,13]. In Sub-Saharan Africa, eBL is the most lethal of childhood cancers, with the highest prevalence in children aged 5–9 years old who are chronically exposed to *P. falciparum* malaria (revised by [14,15]). Malaria appears to play multiple roles in eBL etiology, including the expansion of latently infected B-cells and the likelihood of c-myc translocation that is a hallmark of BL tumors [16–

19]. Of relevance, the aggressive eBL childhood cancer seems to be exclusively linked to *P. falciparum* exposure, but not to other human malaria parasites [20].

Despite the compelling evidence indicating a role for *P. falciparum* in impaired immune responses that control EBV infection [21–23], the impact of acute EBV infection on the generation of anti-malarial immunity is uncertain [24]. Notwithstanding, rodent models of EBV demonstrate that it is possible for a primary gammaherpes virus infection to negatively modulate the generation of antimalarial immunity [7]; an outcome that was correlated with a defect on the generation of humoral immunity to a secondary malaria infection. Evidence of the immune suppressive nature of an acute EBV infection on the development of malaria immunity has also been suggested in experimentally marmosets co-infected with EBV and the quartan malaria *P. brasilianum* [25].

Considering the B-cell compartment as the primary niche for EBV persistence [11] and that humoral malaria immunity may be altered during EBV co-infection [7], we hypothesized here that EBV co-infection could impact on the naturally acquired antibody responses to *P. vivax*, the most geographically widespread human malaria parasite [26]. Taking into account the rapid spread of *P. vivax* drug-resistant strains [27], and the potential for relapse, progress towards the development of a *P. vivax* vaccine is critical (reviewed in [28]). In this perspective, studying *P. vivax* immunity in the context of EBV co-infections can enhance our understanding of malaria-protective immunity and progress towards the design of next-generation malaria vaccines. Here, we took advantage of a longitudinal follow-up study previously carried out in the Amazon rainforest, where *P. vivax* IgG responders were identified to major leading *P. vivax* blood-stage vaccine candidates [29–31], including the Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1) [32]; the 19-kDa C-terminal region of the Merozoite Surface Protein-1 (MSP1-19) [33]; and the Duffy Binding Protein region II (DBPII), a key ligand involved in the main *P. vivax* reticulocyte invasion pathway [34]. Since DBPII induces both strain-specific [35], and strain-transcending antibody responses [36], we also included in this study a novel engineered DBPII construct (DEKnull-2) associated with broad DBPII antibody responses [37]. To investigate whether a persistent EBV infection could interfere with this profile of *P. vivax* antibody responses, we examined in the study population the presence of circulating viral DNA over the time as well as EBV antibody response to lytic viral capsid antigen -VCA, replication activator protein—ZEBRA, early diffuse antigen- EAd, and latent EBV nuclear antigen 1—EBNA-1 (revised by [38]).

Methods

Ethics statement

The ethical and methodological aspects of this study were approved by the Ethical Committee of Research on Human Beings from the René Rachou Institute (Reports No. 007/2006, No. 07/2009, No.12/2010, No. 26/2013 and CAAE 50522115.7.0000.5091), according to the Resolutions of the Brazilian Council on Health (CNS-196/96 and CNS-466/2012). Formal written consent was obtained from all participants, which was also obtained from the next of kin, caregivers, or guardians on the behalf of child participants.

Area and study population

The study was carried-out in the agricultural settlement of Rio Pardo (1°46'S—1°54'S, 60°22'W—60°10'W), Presidente Figueiredo municipality, Northeast of Amazonas State in the Brazilian Amazon region. The methodological approach involved a retrospective study, in which local malaria transmission pattern was described in detail elsewhere [29,39]. In this area, malaria transmission is considered hypo to mesoendemic, and most residents were

natives of the Amazon region. Inhabitants of the settlement live on subsistence farming and fishing along the small streams. In the study area, *P. falciparum* malaria incidence has decreased drastically in recent years, and *P. vivax* is now responsible for all clinical malaria cases reported [30].

Study design and cross-sectional surveys

A population-based open cohort study was initiated in November of 2008 and included three cross-sectional surveys carried at six-months interval (baseline, 6 and 12-months), and distributed in periods of high and low malaria transmission (S1 Fig), as previously reported [29]. Briefly, (i) interviews were conducted through a structured questionnaire to obtain demographic, epidemiological, and clinical data; (ii) physical examination, including body temperature and spleen/liver size were recorded according to standard clinical protocols; (iii) venous blood was collected for individuals aged five years or older (EDTA, 5 mL); and (iv) examination of Giemsa-stained thick blood smears for the presence of malaria parasites by conventional light microscopy, with *P. vivax* infection confirmed later by a species-specific real-time PCR as described [40]. The geographical location of each dwelling was recorded using a hand-held 12-channel global positioning system (GPS) (Garmin 12XL, Olathe, KS, USA) with a positional accuracy of within 15 m. For the current study, the non-eligible criteria were (i) refusal to sign the informed consent; (ii) young children (<5 years), as children have not yet developed a robust malaria-specific antibody response [41]; (iii) pregnant women; (iv) any other morbidity that could be traced; and (v) individuals who were unable to be recruited during all three consecutive cross-sectional surveys. Initially, 360 participants were eligible to the current study. The methodological strategy further involved screening all 360 malaria-exposed individuals according to the detection of circulating EBV-DNA during the baseline and consecutive cross-sectional surveys (6-months, 12-months). For the current study, we focused on two sub-groups of malaria-exposed individuals (i) individuals whose EBV-DNA could be persistently detected in peripheral blood (PersV_{DNA}) and (ii) an age-matched subgroup whose viral DNA was undetected throughout the follow-up period (NegV_{DNA}) (Table 1).

As adults can have antibodies against EBV for the rest of their lives [38], plasma samples of a group of children (n = 34; median age 9 years, IQR 8–11) were used to confirm the sensitivity and specificity of the EBV-peptides used in serological assays.

Table 1. Demographic, epidemiological, and parasitological data of malaria-exposed individuals whose EBV-DNA could be detected (PersVDNA) or not (NegVDNA) in the peripheral blood during the 12-month follow-up period.

Characteristic	PersV _{DNA}	NegV _{DNA}	p value
	(n = 27)	(n = 29)	
Age, median, years (IQR) ^a	38 (22–54)	33 (27–42)	p = 0.1227
Gender ratio, male:female	1.5/1	0.9/1	p = 0.4357
Years of malaria exposure, median (IQR) ^b	32 (16–51)	33 (25–40)	p = 0.7233
Years of residence in Rio Pardo, median (IQR) ^c	8 (4–10)	9 (3–14)	p = 0.2326
Riverine population, n (%) ^d	4 (15%)	6 (21%)	p = 0.7308
Self-reported malaria episodes, median (IQR)	5 (2–11)	11 (3–21)	p = 0.1410
Acute <i>Plasmodium vivax</i> infection, n (%) ^e			
Baseline	6 (22%)	6 (21%)	
6 months	1 (4%)	3 (10%)	
12 months	4 (15%)	5 (17%)	

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010305.t001>

Recombinant blood stage *P. vivax* proteins and IgG antibodies detection

DBPII-related antigens. *DBPII-Sal1*, a recombinant Duffy binding protein region II (DBPII) including amino acids 243–573 of the Sal-1 reference strain [42], and recombinant *DEKnull-2*, an engineered DBPII immunogen [37], were expressed as a 39kDa 6xHis fusion protein, properly refolded, as previously described [37,43]. **MSP1-19 antigen.** The 19-kDa C-terminal region of the Merozoite Surface Protein-1 of *P. vivax* (MSP1-19), which represents amino acids 1616–1704 of the full-length MSP-1 polypeptide, has been described elsewhere [44]. **AMA-1 antigen.** The ectodomain of *P. vivax* Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1), encompassing amino acids 43 to 487, were produced as previously described [45]. To enable purification, MSP1-19 and AMA-1 constructs were also produced as carboxyl-terminal 6xHis-tag fusion proteins from *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*, respectively. **Conventional Enzyme-Linked Immunoassays (ELISA) for *P. vivax* IgG antibodies** was carried out using *P. vivax* blood-stage recombinant proteins as previously described [30], with serum samples at a dilution of 1:100. Recombinant proteins were used at a final concentration of either 3 µg/mL (DBPII and DEKnull-2) or 1 µg/mL (MSP1-19 and AMA-1). For each protein, the results were expressed as ELISA reactivity index (RI), calculated as the ratio of the mean optical density (OD at 492 nm) of each sample to the mean OD plus three standard deviations of negative control plasma samples from 30 individuals living in a nonendemic area of malaria (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) and who have never been exposed to malaria transmission (unexposed volunteers). Values of RI > 1.0 were considered seropositive.

EBV antigens and serostatus

EBV-specific antibodies were detected using 4 synthetic peptides covering immunodominant epitopes of the viral capsid antigen P18 (VCA-p18 [BFRF3]), EBV nuclear antigen 1 (EBNA1 [BKRF1]), early diffuse antigen complex (EAd-p45/52 [BMRF1]) and BZLF1-encoded replication activator protein of EBV (Zebra [BZLF1]) [46,47]. All synthetic peptides were kindly provided by Dr. J. M. Middeldorp (VU University Medical Center, Amsterdam, Netherland). For the assessment of the levels of antibodies to lytic (VCA-p18, EAd and Zebra) and latent EBV antigens (EBNA1), we used synthetic peptide-based ELISA assays as described [48,49]. Briefly, each peptide was used at final concentration of 1 µg/mL with plasma samples diluted 1:100. IgM (VCA, Zebra and EAd) and IgG (VCA and EBNA-1) reactivities were determined using commercial anti-human IgM and IgG secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich). For each experiment, plasma samples from subjects with or without a history of mononucleosis infection who had previously been screened for the presence or absence of EBV-specific antibodies were included as positive (EBV seropositive, n = 8) or negative controls (seronegative, n = 5), respectively. As recommended by the original protocol [46], all OD 450 values were normalized by subtracting the value for 1:100-diluted EBV-negative sera used in duplicate in each ELISA run. Receiver-operating characteristic (ROC) curves was used to determine optimal cutoff points for each peptide (S2 Fig). Based on the area under the ROC curve (AUC) the follow ELISA's cutoff were established: (i) 0.38 for VCA IgG (82% sensitivity; 83% specificity), (ii) 0.20 for EBNA-1 IgG (75% sensitivity; 100% specificity), (iii) 0.43 for VCA IgM (82% sensitivity; 100% specificity), (iv) 0.37 for ZEBRA IgM (90% sensitivity; 100% specificity) and (v) 0.44 for EA-d IgM (85% sensitivity; 100% specificity).

EBV DNA detection by real-time PCR

The PCR primers for this assay were previously selected in the single-copy BALF-5 gene encoding the viral DNA polymerase [50]; the upstream and downstream primer sequences were 5'-CGGAAGCCCTCTGGACTTC-3' and 5'-CCCTGTTTATCCGATGGAATG-3',

respectively, with a fluorogenic probe (5'-TGTACACGCACGAGAAATGCGCC-3') with a sequence located between the PCR primers. Detectable DNA from EBV was identified by a real-time PCR assay as previously described [51,52]. Briefly, DNA from whole blood samples collected in EDTA was extracted using Purogene blood core kit B (Qiagen, Minneapolis, MN, USA). The PCR reaction was performed using a mixture containing 1 μ L of DNA, 0.2 μ M each primer, 0.1 μ M fluorogenic probe, and 5 μ L of TaqMan Master Mix (PE Applied Biosystems), and the PCR cycle was performed as follows: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. The TaqMan Master mix (PE Applied Biosystems) was used for all reactions. For all PCR analyses, water was used as negative control, and B958 and P3HR1 viral DNA were used as positive controls. The B958 and P3HR1 viral strains were kindly provided by Dr. Talita A. F. Monteiro (Federal University of Pará, PA, Brazil) and were described elsewhere [53]. Samples were defined as negative if the CT values exceeded 40 cycles.

Quantification of EBV-DNA copies by the digital droplet PCR (ddPCR)

The ddPCR assays were prepared using the same primers and probes used in qPCR, with a total of 22 μ L per reaction containing ddPCR reagents (10 μ L of the Bio-Rad 1X ddPCR Super Mix [no dUTP], 900 nM of forward and reverse primers, and 250 nM of the probe), and 2 μ L of the DNA template. Initially ddPCR was carried out in a Bio-Rad Droplet Generator with a Droplet Digital PCR System used to automatically generate droplets. To optimize the PCR annealing temperature, a temperature gradient of 54–63°C was used. An annealing temperature of 55°C provided better separation between the positive and negative droplets for EBV. Endpoint PCR assays were performed using the following cycling parameters: enzyme activation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30s, and primer annealing at 55°C for 1 min. The results were analyzed using a Bio-Rad Droplet Reader. A threshold to promote better droplet separation of low amplitude fluorescence was determined at 3,000 RFU for EBV assays based on the droplet separation limit of blank assays. Target quantification was expressed as copies/ μ L of the ddPCR reaction.

Statistical analysis

A database was created using Epidata software (<http://www.epidata.dk>). The graphics and the statistical analysis were performed using GraphPad Prism version 9.1.2—GraphPad Software, La Jolla California USA. Receiver operating characteristic curves (ROC) analysis was used to determine optimal Cut-off values for EBV peptides in ELISA assays. For the statistical analyses, the antibody response was defined either as a binary categorical variable (the proportion of seropositive individuals) or as a continuous variable (the levels of antibody response); differences in two medians were tested by Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis when there are two or more medians; differences in proportions were evaluated by chi-square test or Fisher's exact test, as appropriated; and correlations between *P. vivax* and EBV antibody responses were examined by Pearson's or Spearman's matrices. In all analysis, a significance level of 5% was considered, i.e., values of $P < 0.05$.

Results

Characteristic of *P. vivax* malaria-exposed groups

At the time of the first cross-sectional survey, 123 (34%) out of 360 Amazonian individuals initially eligible for the study had detectable EBV-DNA in the peripheral blood. Further surveys (6- and 12-month later) identified 27 out of 123 individuals as persistent viral DNA carriers,

i.e., individuals whose EBV-DNA was amplified (*balf-5* gene) from the peripheral blood during all follow-up period (PersV_{DNA}). In parallel, we selected a group of 29 age-matched malaria-exposed individuals with no detectable viral DNA in the peripheral blood (NegV_{DNA}) (Table 1). Demographic, parasitological, and epidemiological variables were comparable between groups. Accordingly, most individuals were adults with similar proportion of male: female, and their age basically corresponding to their lifetime exposure to malaria in the Amazon area (medians of 32 and 33 years for PersV_{DNA} and NegV_{DNA}, respectively). In this long-term malaria exposed individuals, few acute malaria infections were detected during the follow-up period (all *P. vivax*, as detected by microscopy and/or species-specific PCR assay) (Table 1).

EBV serostatus of *P. vivax* malaria-exposed groups

In these immunocompetent adults, all individuals were seropositive for at least one EBV peptide during the follow-up period (S3 Fig). Despite of that, individuals categorized as PersV_{DNA} had a much broader EBV antibody response than NegV_{DNA} group; specifically, while 42% of EBV-DNA carriers respond to all five EBV-ELISA markers, only 15% of NegV_{DNA} group responded to these markers (chi-square test = 4.276; $p = 0.038$). A similar profile of response was detected over the time (S3 Fig). From the panel of 4 EBV antigens, only IgG response to the lytic antigen VCA-p18 showed a clear differentiation between PersV_{DNA} and NegV_{DNA} groups (Fig 1). At enrollment, while 89% of PersV_{DNA} had a positive IgG antibody response to VCA-p18, only 45% of NegV_{DNA} had IgG VCA-p18 (chi-square test; $p = 0.0006$). Of interest, the difference in response between groups remained constant throughout the follow-up period, i.e., 85% vs. 38%, $p = 0.0004$; and 86% vs. 41%, $p = 0.0009$, for PersV_{DNA} and NegV_{DNA}, respectively). The levels of antibodies to VCA-p18 were also significantly different between groups (Mann-Whitney test), with levels ranging from 0.70 to 0.77 for PersV_{DNA} and from 0.34 to 0.40 for NegV_{DNA} groups (Fig 1). Considering the individual EBV antibody response over time, we observed low individual variability, i.e., high/low VCA-p18 responders retained their antibody profile throughout the follow-up period (S4 Fig).

Although IgM antibodies to EBV lytic antigens (VCA-p18, EAd-p45/52 and Zebra) did not show any differences between the study groups, at the individual level, a positive IgM response for one EBV antigen was related to positivity for the others (S5 Fig); of note, this IgM response profile was sustained throughout the study period. Further, we compared the pattern of humoral antibody responses to all EBV antigens between PersV_{DNA} and NegV_{DNA} (Fig 2). In the PersV_{DNA} group, there was a tendency of positive correlation between EBV-specific antibodies, specially to IgM antibodies. On the contrary, NegV_{DNA} group was characterized by a predominance of negative antibody correlations to several EBV antigens.

Plasmodium vivax antigen-specific antibody responses in persistent viral DNA carriers

To investigate whether the continuous detection of EBV-DNA in the peripheral blood would impact the humoral response to *P. vivax* malaria, we evaluated antibodies to leading *P. vivax* blood-stage vaccine candidates (DBPII-related antigens, AMA-1 and MSP1-19). In general, there was no clear difference in the proportion of responders between groups, however, the levels of antibody response to different *P. vivax* antigens were significantly different between PersV_{DNA} and NegV_{DNA}. The antibody response to the engineered DBPII immunogen (DEKnull-2) showed a trend towards lower antibody levels in PersV_{DNA} compared with NegV_{DNA} (Fig 3). Specifically, while DEKnull-2 serological reactivity index (RI) ranged from 0.59 to 0.95 for PersV_{DNA}, RI values ranged from 2.11 to 3 for NegV_{DNA} group. The difference

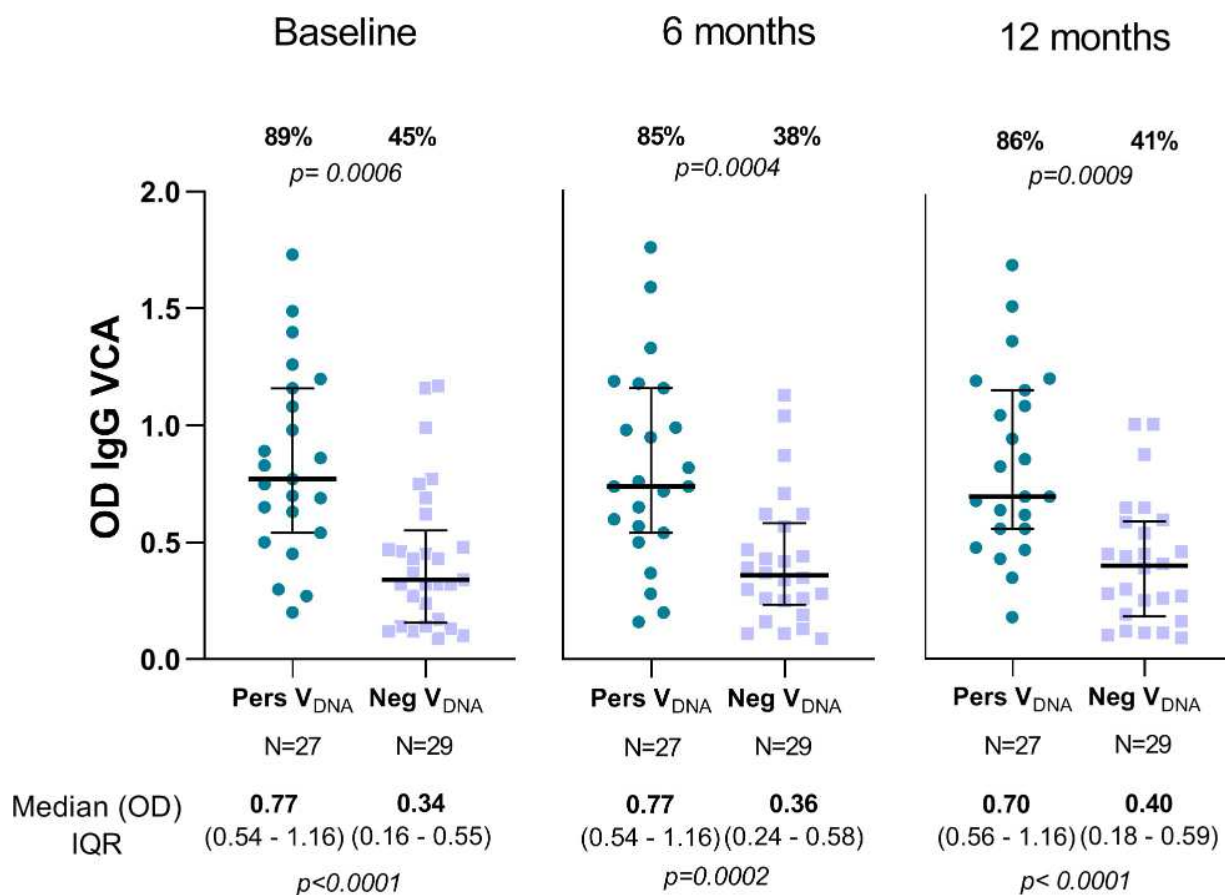


Fig 1. Profile of IgG antibody response against EBV capsid antigen p18 (VCA-p18) in individuals whose EBV-DNA could be detected (PersV_{DNA}) or not (NegV_{DNA}) over the follow-up period. For each graphic, individual datapoints were expressed as ELISA absorbance (OD) and shown here as a scatter dot plots with lines showing the median with interquartile range (IQR). Numbers represented in the top and bottom of graphics represent the proportion of responders (%) and median (OD) with IQR values, respectively; p-values for significant difference between groups were included and calculated as described in methods. The proportion of responders was determined by considering an OD > 0.38 as ELISA-positive response (S2 Fig). All raw data are available in the S1 Table.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010305.g001>

intra-group remained relatively stable overtime (Fig 3B). A similar pattern was observed with the original DBPII protein (S6 Fig). For *P. vivax* MSP1-19, the differences between the groups were less pronounced (Fig 4), with statistically significant differences observed only during high transmission period at the study baseline (Fig 4). Circulating antibodies against AMA-1 showed a similar pattern of response as MSP1-19 (S7 Fig).

In general, antibodies against *P. vivax* blood antigens did not correlate with EBV antibody response (S8 Fig). A similar pattern was found for PersV_{DNA} and NegV_{DNA} overtime, except for an unexpected positive association between DEKnull2 antibodies and IgM Ead in the PersV_{DNA} (S8 Fig).

Finally, to investigate whether EBV-DNA copy number in the peripheral blood would influence *P. vivax*-specific antibodies response, a digital droplet PCR (ddPCR) was carried in consecutive samples of the PersV_{DNA} group. In general, the EBV DNA copies/ μ L in the PersV_{DNA} was relatively low, range from 0.79 (baseline) to 0.84 copies/ μ L at the end of the follow-up period (S9A Fig) and remained < 1 copy/ μ L in most of malaria-exposed individuals (S9B Fig). While the EBV-DNA copy number correlated with VCA-p18 IgG antibodies (S9C Fig), the EBV-DNA copies “per se” did not influenced in *P. vivax*-specific antibodies (S10 Fig).

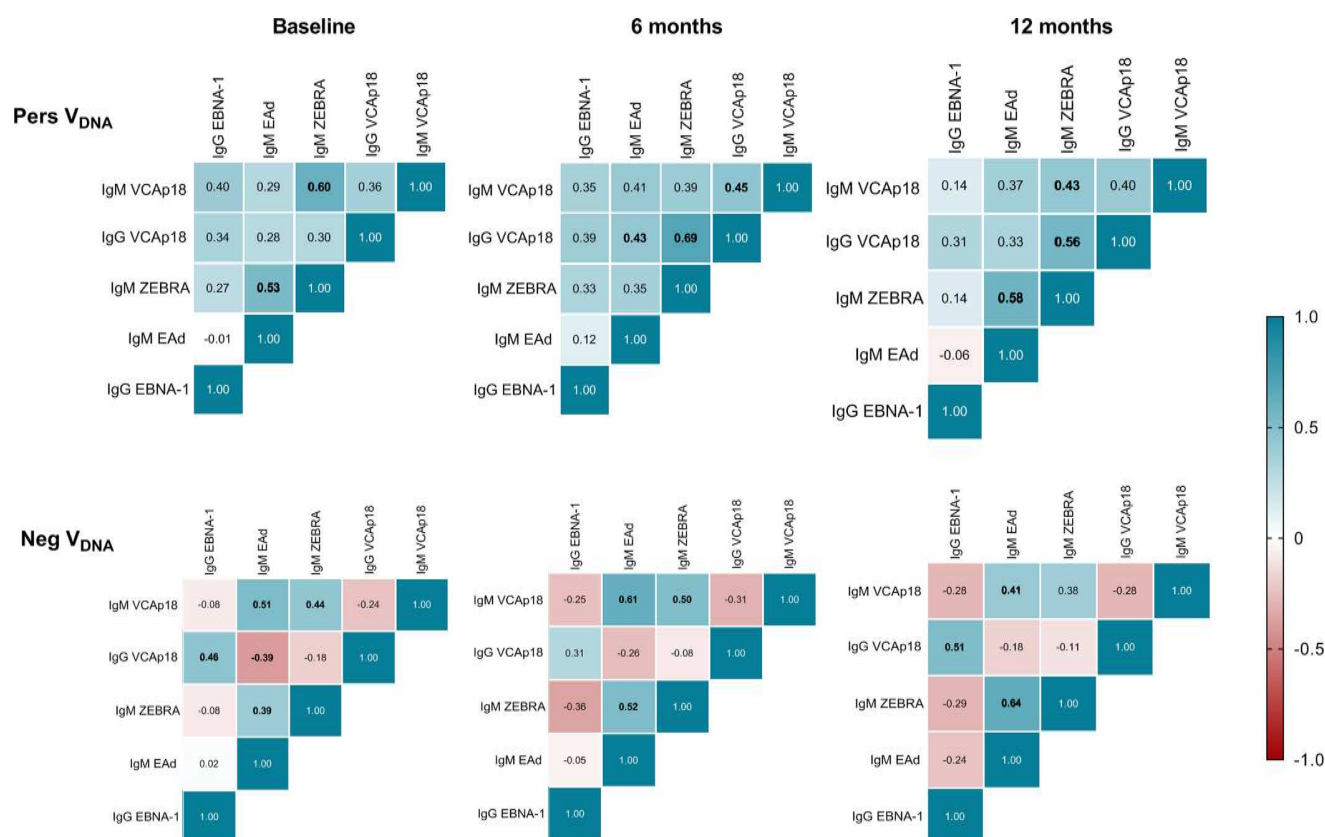


Fig 2. Pairwise correlations between EBV antibody levels in individuals whose EBV-DNA could be detected (PersV_{DNA}) or not (NegV_{DNA}) over the follow-up period. Clustering was based on the Spearman correlation coefficient for assays measuring anti-EBV antibodies in plasma samples [IgM (VCA-p18, Zebra and EAd-p45/52) and IgG (VCA-p18 and EBNA-1)]. Matrix heatmaps were shown for each cross-sectional survey (baseline, 6- and 12-months), with top and bottom panels representing PersV_{DNA} and NegV_{DNA} groups, respectively. Positive correlations shown in blue and negative correlations shown in red, with numbers in bold statistically significant differences.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010305.g002>

Discussion

In the Amazon rainforest both malaria and EBV infections are common, yet Burkitt's lymphoma (BL) is rare [54]; this is not unexpected as endemic BL (eBL) is linked to *P. falciparum* exposure, but not to other malaria parasites [20]. While *P. vivax* malaria is a public health problem in the Amazon, immunological outcomes of prevalent viral co-infections are often neglected [55–57]. Here, we sought to investigate whether a continuous detection of EBV-DNA in peripheral blood of *P. vivax* malaria-exposed adults (PersV_{DNA}) could impact antibody response to key *P. vivax* blood-stage vaccine candidates. In this context, it is possible to speculate that a positive PersV_{DNA} status may reflect a reactive EBV persistence with associated deregulated (activated) B-cell function. Consecutive cross-sectional surveys demonstrated that levels of *P. vivax*-specific antibodies were in general lower in the PersV_{DNA} group compared with age-matched negative DNA carriers living in the same malaria-endemic village (NegV_{DNA}). Interestingly, significant differences in antibody levels were observed against a novel DBPII immunogen, DEKnull-2, that has been associated with stronger, broader, and long-term neutralizing antibody response in the study area [31,37]. For DEKnull-2, the difference in the magnitude of the antibody response between PersV_{DNA} and NegV_{DNA} groups ranged from two to four-fold, and these differences were maintained throughout the follow-up

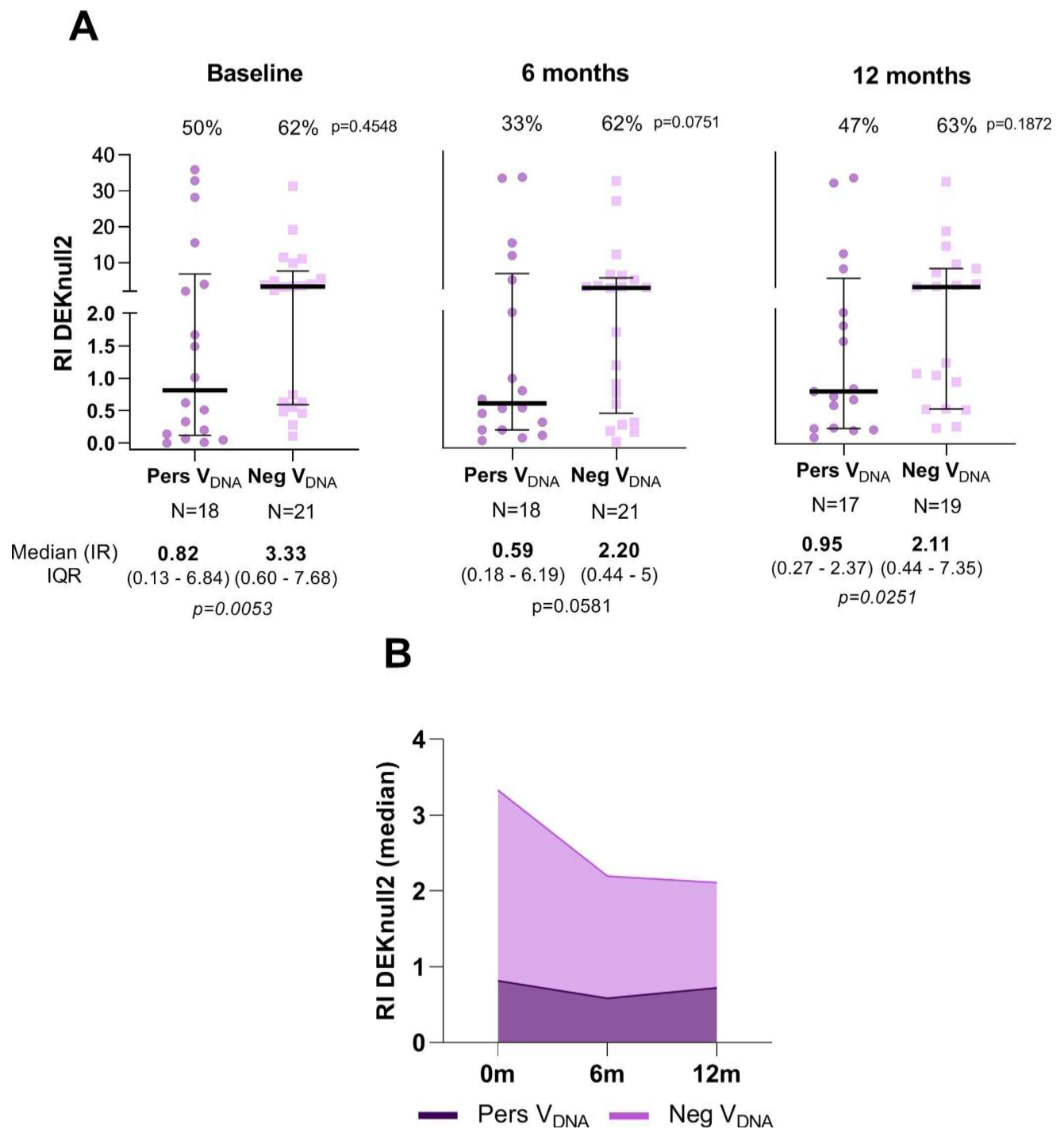


Fig 3. Profile of IgG antibody response against the surface-engineered DEKnull-2 vaccine of *P. vivax* in individuals with (PersV_{DNA}) or without (NegV_{DNA}) persistent viral DNA over the follow-up period. In **A**, results are shown by cross-sectional surveys (baseline, 6- and 12-month), with individual data points expressed as ELISA Reactivity Index (RI) and shown here as a scatter dot plots with lines showing the median with interquartile range (IQR). In **B**, medians of RIs overtime for each group. Numbers in the top and bottom of each graphic represent the proportion of responders (%) and median (RI) with IQR values, respectively; p-values for significant difference between groups were included and calculated as described in methods. Reactivity Index (RI) was calculated as described in methods and RI > 1 corresponded to an ELISA-positive response.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010305.g003>

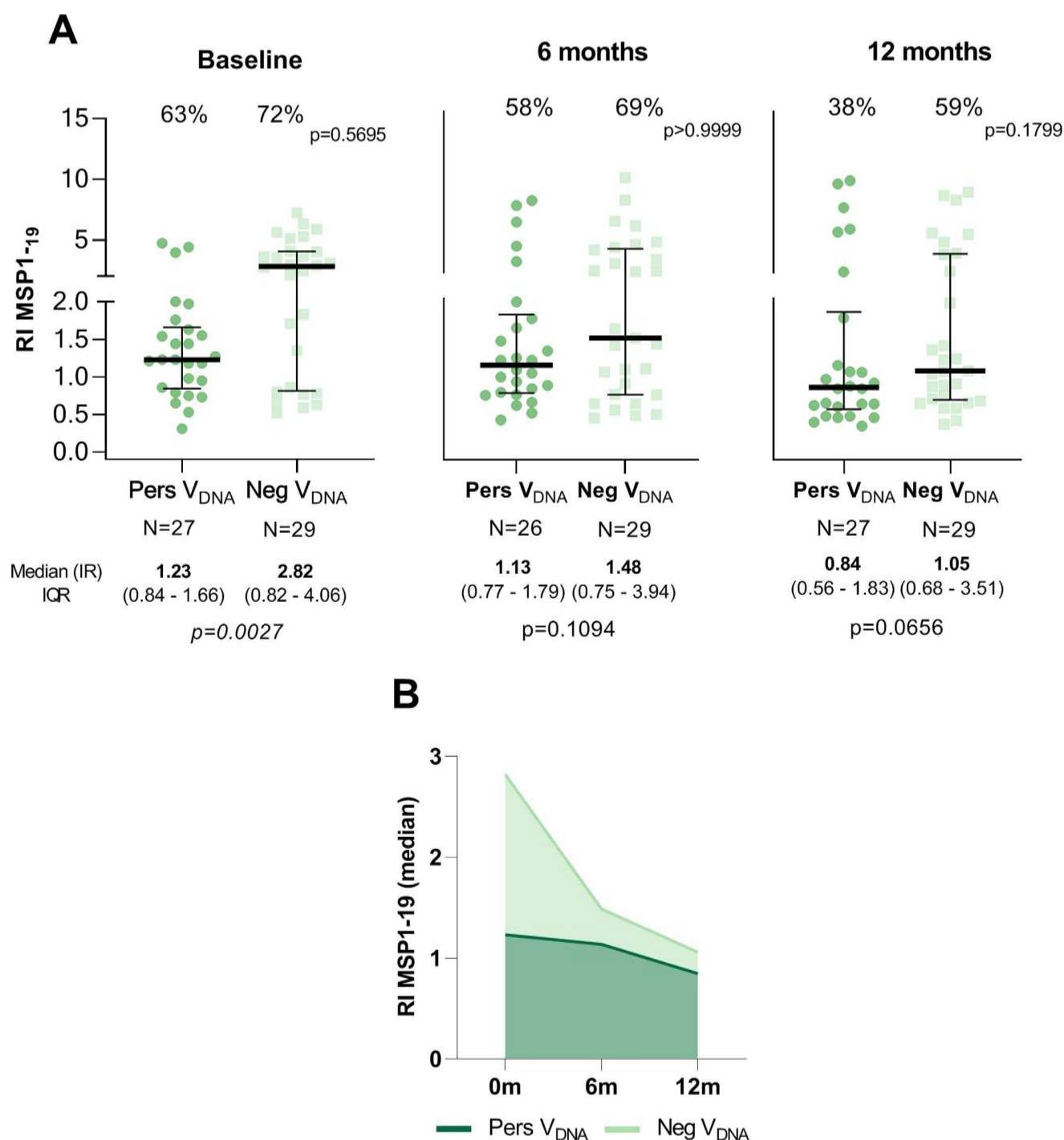


Fig 4. Profile of IgG antibody response against the 19-kDa C-terminal region of the Merozoite Surface Protein-1 (MSP1-19) in individuals with (Pers_{V_{DNA}}) or without (Neg_{V_{DNA}}) persistent viral DNA over the follow-up period. In **A**, results are shown by cross-sectional surveys (baseline, 6- and 12-month), with individual data points expressed as ELISA Reactivity Index (RI) and shown here as a scatter dot plots with lines showing the median with interquartile range (IQR). In **B**, medians of RIs overtime for each group. Numbers in the top and bottom of each graphic represent the proportion of responders (%) and median (RI) with IQR values, respectively; p-values for significant difference between groups were included and calculated as described in methods. Reactivity Index (RI) was calculated as described in methods and RI > 1 corresponded to an ELISA-positive response.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010305.g004>

period. While DEKnull-2 was developed to overcome the inherent DBPII bias towards developing strain-specific immunity associated with poor immunogenicity [35], our methodological approach also included a common DBPII variant (Sal1) circulating in the Amazon area [29]. A similar profile of response was observed for the native Sal1-DBPII variant, in which less reactivity was observed in the PersV_{DNA} group. Taken together, the results suggested that long episodes of EBV-DNA detection may influence the levels of both strain-specific and strain-transcending DBPII immune responses.

With respect to more immunogenic blood stage *P. vivax* antigens, such as MSP1-19 [58], the difference in the magnitude of antibody response between the groups was less pronounced and observed only in samples collected at baseline (PersV_{DNA} < NegV_{DNA}), when malaria transmission was more evident in the study area. Although the reasons for the difference in the profile of antibody response between *P. vivax* antigens are not known, we can speculate that local seasonal variation in malaria transmission may have played a role, as antibodies against MSP1-19 /AMA-1 may fluctuate considerably according to malaria transmission [59–61]. In accordance, we previously demonstrated that levels of MSP1-19/AMA-1 (but not DBPII-specific antigens) dropped when malaria transmission was reduced [30]. Considering that our study design involved temporal variation in malaria transmission profile (S1 Fig), it is reasonable to consider that lowest levels of these antibodies detected at 6 and 12 months of the follow-up (i.e., in the NegV_{DNA} group) may have masked the difference between PersVDNA and NegVDNA groups. Even though our sample size precluded a more robust statistical analysis, the median for MSP1-19 dropped from 3.7 (at enrollment) to 0.8–1.16 (6 and 12 months, respectively), and for AMA-1 from 2.82 to 1.48–1.05. Future studies should consider the wide range of immunogenicity between *P. vivax* blood stage proteins.

It is also worth mentioning that in this immunocompetent malaria-exposed adult population, we avoid to staging EBV infection based on serology. As we are dealing primarily with an adult population, individuals from both groups presented antibodies against at least one EBV antigens. Here, EBV serological profile was used as complementary tool to describe the serostatus of PersV_{DNA} versus NegV_{DNA} group. For that, EBV serology was built upon an extensive panel of EBV antigens, which included antigens from both latent and lytic stages [38]. More specifically, we used EBV-specific polypeptides targeting the most frequent serological markers of EBV such as the viral capsid antigens (VCA-p18), the early antigens (EAD-p47/54), Epstein–Barr nuclear antigens (EBNAs) as well as the major transcription factor of EBV expressed upon EBV lytic cycle activation (Zebra) [62]. This is a common panel used in studies involving co-infection of malaria falciparum and EBV [49,51,63]. Based on this panel of EBV antigens, it was possible to demonstrated that PersV_{DNA} had a much broader EBV antibody response than the NegVDNA group, with a significant proportion of viral DNA carriers recognizing all 5 serological markers used here. Considering individual EBV serological markers, only IgG VCA-p18 distinguished PersV_{DNA} and NegV_{DNA} groups during the follow-up study, (85–89% vs. 38–45%, respectively). Actually, measuring VCA-IgG antibodies seems to be a best single test to indicate a previous EBV infection [64]. Notwithstanding, in the PersV_{DNA} group, IgG-VCA antibodies tended to be associated with IgM antibodies to lytic antigens (VCA-p18, EAd-p45/52 and Zebra). According, only the levels of IgG VCA-p18 correlated with the number of EBV-DNA copies, suggesting that these EBV-DNA carriers may have a frequent/constant reactivation of the EBV over the months.

Intriguingly, EBV-IgM responses were relatively stable during the cross-sectional surveys (in both groups for all EBV antigens). Although the reasons for these findings are unclear, concerns have been raised about possible cross-reactivities of EBV-IgM antibodies with other antigenically related viral infections [65–67], such as CMV that is prevalent in the Amazon area [68]. Although IgM cross-reactivity could not be ruled out, the tendency of correlation with

EBV-DNA may reflect constant EBV activation-triggering of B-cells; in fact, EBV persistently infecting naive or anti-EBV B-cells leading to increased IgM levels [69,70]. This is conceivable since it has been demonstrated that a large proportion of circulating B cells from healthy EBV-exposed subjects were committed to the production of IgM antibodies that were polyreactive and bound a variety of self- and exogenous antigens [71]. These findings may explain the unexpected association between DEKnull2 antibodies and IgM EAd-p45/52. Perhaps a plausible, and not mutually exclusive explanation, for our results of long-lasting IgM response is the unappreciated role of the IgM antibodies in natural infections. To diverse immunogens and pathogens, it has been demonstrated that long-lived antigen-induced IgM plasma cells demonstrate somatic mutations, contribute to long-term protection, and may persist for a lifetime [72]. Together, these findings emphasize the need to understand the role of the IgM specific antibodies in natural infections and vaccines development [73].

While the persistence of the IgM response in our adult cohort merits further investigations, it is important to clarify about the high sensitivity and specificity of the EBV-peptides used in our ELISA assays. According, in a group of 34 Amazonian children (median age 9 years, IQR 8–11) whose plasma samples were screened for anti-EBV antibodies using the same peptide-based ELISA protocol, we found that VCA-IgM and Zebra-IgM antibodies decreased over time while VCA-IgG and EBNA-IgG increased within same period of time (12-month follow-up) and remained positive throughout the observation period (S11 Fig). These results confirmed the typical pattern of seroconversion of young children with low socioeconomic status [38], correlating with an early EBV seroconversion for Latin America population [74].

As expected, few malaria cases were detected in our malaria semi-immune study population, which precluded our ability to evaluate an association between acute *P. vivax* infection and persistent detection of EBV-DNA. Although the current study was not designed to investigate whether EBV can change the course of an acute *P. vivax* malaria infection, scant data from Indonesia suggest that whereas EBV-DNA levels were significantly elevated in high parasitemic *P. vivax* individuals, EBV-DNA levels were not related to age, gender, or malaria symptoms [75]. To properly address the influence of the persistence of EBV-DNA detection in the course of vivax malaria, a non-immune symptomatic *P. vivax* population should be investigated that was out of the scope of the current study.

Our study has limitations that should be considered when interpreting the results. First, a relatively small number of malaria-exposed residents were eligible to participate in the study, which may have underpowered some statistical analyses. Specifically, the 12-month cohort study demonstrated that only 27 out of 360 individuals presented persistent detection of EBV-DNA in peripheral blood. At this time, it is difficult to compare the frequency of EBV-DNA detected in our study to the frequency detected in other studies. Particularly, because in immunocompetent individuals the frequency of detection of EBV-DNA in blood can vary widely, and this can be influenced by several factors, including differences in the study population, seasonality and other co-infections present in the study area [76,77]. Also, differences in DNA target, PCR protocols and biological specimens may lead to underestimate or overestimate the prevalence of DNA in blood [78]. Here, we have decided to extract DNA from the whole blood because EBV-DNA in plasma/serum may suggesting viremia; despite of that, our protocol did not allow to differentiate EBV DNA from cell free (plasma/serum) from cell-associated form (non-infectious).

Recently, an elegant study involving the blood virome of healthy individuals showed that 21% of studied blood samples had EBV expression [79]. Here, even among the small sample used, we were able to detect EBV-DNA in 34% of our samples (123 out of 360) with roughly 8% classified as long-term EBV-DNA carriers (27 out of 360). Still, large longitudinal studies are warranted to accurately determine prevalence in health individuals over time.

Additionally, the small number of participants precluded the use of a multivariate model to control confounding variables. However, our control group was adjusted by major confound variables such as age, time of exposure and time living in the study area; consequently, we believe that this did not significantly influence our findings. Notwithstanding these limitations, we are confident about the robustness of the study design, which allowed us to demonstrate for the first time that antibody levels to different *P. vivax* antigens were significantly lower in subjects with persistent EBV “DNAmia”. As the main host cell of the EBV is the human B cell (reviewed by [80]), ongoing experiments are in progress to evaluate on the role of a persistent detection of EBV-DNA in the long-term *P. vivax*-specific B cell response. In this proof-of-concept study, we provide evidence that a persistent detection of EBV in peripheral blood of an adult *P. vivax* semi-immune population may impact the long-term malaria immune response to major malaria vaccine candidates.

Supporting information

S1 Table. Individual data from the study population grouped according to the detection (PersVDNA) or not (NegVDNA) of viral DNA over the follow-up period.

(XLSX)

S1 Fig. Monthly-time series of malaria cases in the agricultural settlement of Rio Pardo (Amazonas, Brazil) during the study period, 2008–2009.

The current study included three cross-sectional surveys at six-month intervals (Baseline, Bs; 6- and 12-months latter). Malaria cases were based on results of conventional microscopy provided by the National Malaria Surveillance System Registry (SIVEP-Malaria), with cases of *P. falciparum* (light blue) and *P. vivax* (dark blue) plotted per month.

(TIF)

S2 Fig. Two-graph receiver operating characteristic curves (TG-ROC) to EBV proteins.

For ELISA-detected antibodies [IgM (VCA-p18, Zebra and EAd-p45/52) and IgG (VCA-p18 and EBNA-1)], the best cutoff values was determined through sensibility and specificity calculated by TG-ROC curves in GraphPad Prism 9.2, as described in material and methods. Assay variability was measured by the coefficient of variation (CV) calculated as the standard deviation of absorbance divided by the mean; CV for positive/negative controls, respectively, were 14.9%/18.97% for IgM VCA-p18; 18.33%/ 12.18% for IgG VCA-p18; 14.34%/ 17% for IgG EBNA-1; 19.94%/ 20.21% for IgM Zebra; 11.4/ 26.9% for EAd-p45/52.

(TIF)

S3 Fig. Frequency of anti-EBV antibodies according to the number of serological markers recognized by individuals whose EBV-DNA could be detected (PersV_{DNA}) or not (NegV_{DNA}) over the follow-up period.

For each group, results were presented as the proportion of responders for one (1), two (2), three (3), four (4) or five (5) EBV serological markers [IgM (VCA-p18, Zebra and EAd-p45/52) and IgG (VCA-p18 and EBNA-1)]. All raw data are available in the [S1 Table](#).

(TIF)

S4 Fig. Profile of individual VCA-p18 antibody response in individuals with (PersV_{DNA}) or without (NegV_{DNA}) persistent viral DNA over the follow-up period.

For both graphics, individual data points were expressed as ELISA absorbance (OD) and shown here as a scatter dot plots. Points were connected representing the individual profile over the follow-up period. The dotted line represents the cut-off value that was determined considering an OD > 0.38 as a positive ELISA response ([S2 Fig](#)) that classified subjects as low/high responders for VCA-

p18.
(TIF)

S5 Fig. Individual antibody response to Epstein-Barr virus (EBV) peptides (VCA-p18, ZEBRA, EAAd-p45/52 and EBNA-1) during the cross-sectional surveys. Heatmaps illustrated individual antibody response of each malaria-exposed individuals classified according to the detection (PersV_{DNA}) or not (NegV_{DNA}) of EBV-DNA over the follow-up period. According to EBV antibody response, individuals were categorized as non-responder (negative) or responders (stratified as low, medium or high, according to EBV antibody reactivity). The missing values are recorded as blank spaces.

(TIF)

S6 Fig. Profile of IgG antibody response against *P. vivax* Duffy Binding Protein region II (DBPII) in individuals with (PersV_{DNA}) or without (NegV_{DNA}) persistent viral DNA over the follow-up period. In **A**, results are shown by cross-sectional surveys (baseline, 6- and 12-month), with individual datapoints expressed as ELISA Reactivity Index (RI) and shown here as a scatter dot plots with lines showing the median with interquartile range (IQR). In **B**, medians of RIs overtime for each group. Numbers in the top and bottom of each graphic represent the proportion of responders (%) and median (RI) with IQR values, respectively; p-values for significant difference between groups were included and calculated as described in methods. Reactivity Index (RI) was calculated as described in methods and RI > 1 corresponded to an ELISA-positive response.

(TIF)

S7 Fig. Profile of IgG antibody response against *P. vivax* Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1), in individuals with (PersV_{DNA}) or without (NegV_{DNA}) persistent viral DNA over the follow-up period. In **A**, results are shown by cross-sectional surveys (baseline, 6- and 12-month), with individual datapoints expressed as ELISA Reactivity Index (RI) and shown here as a scatter dot plots with lines showing the median with interquartile range (IQR). In **B**, medians of RIs overtime for each group. Numbers in the top and bottom of each graphic represent the proportion of responders (%) and median (RI) with IQR values, respectively; p-values for significant difference between groups were included and calculated as described in methods. Reactivity Index (RI) was calculated as described in methods and RI > 1 corresponded to an ELISA-positive response.

(TIF)

S8 Fig. Pairwise correlations between EBV and *P. vivax* antibody levels in individuals with (PersV_{DNA}) or without (NegV_{DNA}) persistent viral DNA during the cross-sectional surveys. Clustering was based on the Spearman correlation coefficient for assays measuring anti-EBV antibodies in serum. Matrix heatmaps were shown for each cross-sectional survey (baseline, 6- and 12-months), with top and bottom panels representing Pers V_{DNA} and Neg V_{DNA} groups, respectively. Positive correlations shown in blue and negative correlations shown in orange, with numbers in bold statistically significant differences.

(TIF)

S9 Fig. EBV-DNA quantification (by ddPCR) in individuals with persistent detection of the EBV DNA (PersVDNA). In **A**, the amplitude of viral DNA is shown by cross-sectional surveys (baseline, 6 and 12 months), with individual data points represented as copy number / μ L. Data are shown here as scatterplots with lines showing the median with interquartile range (IQR) (values shown below each cross-section). In **B**, the dots were connected representing individual variability in EBV-DNA copies overtime, and in **C**, the association between

anti-VCA-p18 IgG antibodies and EBV-DNA copies, as analyzed by the Spearman's correlation coefficient ($r = 0.32$ and $p < 0.05$).

(TIF)

S10 Fig. Absence of correlation between the levels of *P. vivax* specific antibody and EBV-DNA copy number (“DNAmia”). The correlation between antibody levels (reactivity index—RI) to *P. vivax* blood stage proteins—DEKnull2 (A), DBP11 (B), MSP1-19 (C), AMA-1 (D)—and the viral DNA detected (copies/ μ L) was based on the Spearman correlation coefficient ($p > 0.05$ for all comparison).

(TIF)

S11 Fig. IgM and IgG antibody response against Epstein-Barr virus peptides in Amazonian children over time. For each EBV-peptide (VCA-p18; Zebra, EAd-p45/52 and EBNA-1) antibody response was represented by frequency of responders (bar) and magnitude of response (optical density-OD median, lines). The results represented three cross-sectional surveys carried-out at 6-month intervals, i.e., at enrollment (0m) and six (6m) and 12-month latter (12m). ELISA assays were carried out as described in the methods.

(TIF)

Acknowledgments

We thank the inhabitants of Rio Pardo for enthusiastic participation in the study; the local malaria control team in Presidente Figueiredo for their logistic support; the units of Fundação Oswaldo Cruz in Manaus, AM (Fiocruz Amazonia), and Belo Horizonte, MG (Fiocruz Minas), for overall support. The Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities at René Rachou Institute (Real-Time PCR Facility; RPT09D). The Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Finance Code 001) and the Program for Institutional Internationalization of CAPES-PrInt/FIOCRUZ is also acknowledged. LHC, TNS and CJFF are research fellows from CNPq. Scholarships were sponsored by CAPES (MGB, EUMM) and CNPq (MGB).

Author Contributions

Conceptualization: Michelle H. F. Dias, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Data curation: Michelle H. F. Dias, Taís N. de Souza, Cor J. F. Fontes, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Formal analysis: Michelle H. F. Dias, Matheus G. Barcelos, Eduardo U. M. Moreira, Taís N. de Souza, Camilla V. Pires, Cor J. F. Fontes.

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

Investigation: Taís N. de Souza, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Methodology: Michelle H. F. Dias, Luiz F. F. Guimarães, Matheus G. Barcelos, Eduardo U. M. Moreira, Maria F. A. do Nascimento, Taís N. de Souza, Camilla V. Pires, Talita A. F. Monteiro, Jaap M. Middeldorp, Irene S. Soares, Cor J. F. Fontes, Francis B. Ntumngia, Flora S. Kano.

Project administration: Luzia H. Carvalho.

Resources: Talita A. F. Monteiro, Jaap M. Middeldorp, Irene S. Soares, Francis B. Ntumngia, John H. Adams, Luzia H. Carvalho.

Supervision: Luzia H. Carvalho.

Validation: Michelle H. F. Dias, Jaap M. Middeldorp, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

Visualization: Michelle H. F. Dias, Flora S. Kano.

Writing – original draft: Michelle H. F. Dias, Luzia H. Carvalho.

Writing – review & editing: Michelle H. F. Dias, Luiz F. F. Guimarães, Matheus G. Barcelos, Eduardo U. M. Moreira, Maria F. A. do Nascimento, Taís N. de Souza, Camilla V. Pires, Talita A. F. Monteiro, Jaap M. Middeldorp, Irene S. Soares, Cor J. F. Fontes, Francis B. Ntumngia, John H. Adams, Flora S. Kano, Luzia H. Carvalho.

References

1. Brooker S, Akhwale W, Pullan R, Estambale B, Clarke SE, Snow RW, et al. Epidemiology of plasmodium-helminth co-infection in Africa: populations at risk, potential impact on anemia, and prospects for combining control. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 77(6 Suppl):88–98. Epub 2008/01/31. PMID: 18165479; PubMed Central PMCID: PMC2637949.
2. Afolabi MO, Ale BM, Dabira ED, Agbla SC, Bustinduy AL, Ndiaye JLA, et al. Malaria and helminth co-infections in children living in endemic countries: A systematic review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021; 15(2):e0009138. Epub 2021/02/19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009138> PMID: 33600494; PubMed Central PMCID: PMC7924789.
3. Mooney JP, Galloway LJ, Riley EM. Malaria, anemia, and invasive bacterial disease: A neutrophil problem? *J Leukoc Biol*. 2019; 105(4):645–55. Epub 2018/12/21. <https://doi.org/10.1002/JLB.3R11018-400R> PMID: 30570786; PubMed Central PMCID: PMC6487965.
4. Nyirenda TS, Mandala WL, Gordon MA, Mastroeni P. Immunological bases of increased susceptibility to invasive nontyphoidal Salmonella infection in children with malaria and anaemia. *Microbes Infect*. 2018; 20(9–10):589–98. Epub 2017/12/19. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.11.014> PMID: 29248635; PubMed Central PMCID: PMC6250906.
5. Kotepui KU, Kotepui M. Prevalence of and risk factors for Plasmodium spp. co-infection with hepatitis B virus: a systematic review and meta-analysis. *Malar J*. 2020; 19(1):368. Epub 2020/10/17. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03428-w> PMID: 33059662; PubMed Central PMCID: PMC7560023.
6. Roberds A, Ferraro E, Luckhart S, Stewart VA. HIV-1 Impact on Malaria Transmission: A Complex and Relevant Global Health Concern. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11:656938. Epub 2021/04/30. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.656938> PMID: 33912477; PubMed Central PMCID: PMC8071860.
7. Matar CG, Jacobs NT, Speck SH, Lamb TJ, Moormann AM. Does EBV alter the pathogenesis of malaria? *Parasite Immunol*. 2015; 37(9):433–45. Epub 2015/06/30. <https://doi.org/10.1111/pim.12212> PMID: 26121587.
8. Falanga YT, Frascoli M, Kaymaz Y, Forconi C, Ong'echa JM, Bailey JA, et al. High pathogen burden in childhood promotes the development of unconventional innate-like CD8+ T cells. *JCI Insight*. 2017; 2(15). Epub 2017/08/05. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93814> PMID: 28768916; PubMed Central PMCID: PMC5543908.
9. Sehrawat S, Kumar D, Rouse BT. Herpesviruses: Harmonious Pathogens but Relevant Cofactors in Other Diseases? *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 8:177. Epub 2018/06/12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00177> PMID: 29888215; PubMed Central PMCID: PMC5981231.
10. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(10):757–68. Epub 2004/10/29. <https://doi.org/10.1038/nrc1452> PMID: 15510157.
11. Thorley-Lawson DA. EBV Persistence—Introducing the Virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015; 390(Pt 1):151–209. Epub 2015/10/02. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_8 PMID: 26424647; PubMed Central PMCID: PMC5125397.
12. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*. 1964; 1(7335):702–3. Epub 1964/03/28. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(64\)91524-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(64)91524-7) PMID: 14107961.
13. Kennedy G, Komano J, Sugden B. Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(24):14269–74. Epub 2003/11/07. <https://doi.org/10.1073/pnas.2336099100> PMID: 14603034; PubMed Central PMCID: PMC283581.
14. Moormann AM, Bailey JA. Malaria—how this parasitic infection aids and abets EBV-associated Burkitt lymphomagenesis. *Curr Opin Virol*. 2016; 20:78–84. Epub 2016/10/01. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.09.006> PMID: 27689909; PubMed Central PMCID: PMC5102755.

15. Jayasooriya S, Hislop A, Peng Y, Croom-Carter D, Jankey Y, Bell A, et al. Revisiting the effect of acute *P. falciparum* malaria on Epstein-Barr virus: host balance in the setting of reduced malaria endemicity. *PLoS One*. 2012; 7(2):e31142. Epub 2012/02/22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031142> PMID: 22347443; PubMed Central PMCID: PMC3275582.
16. Torgbor C, Awuah P, Deitsch K, Kalantari P, Duca KA, Thorley-Lawson DA. A multifactorial role for *P. falciparum* malaria in endemic Burkitt's lymphoma pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2014; 10(5):e1004170. Epub 2014/05/31. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004170> PMID: 24874410; PubMed Central PMCID: PMC4038605.
17. Robbiani DF, Deroubaix S, Feldhahn N, Oliveira TY, Callen E, Wang Q, et al. Plasmodium Infection Promotes Genomic Instability and AID-Dependent B Cell Lymphoma. *Cell*. 2015; 162(4):727–37. Epub 2015/08/16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.019> PMID: 26276629; PubMed Central PMCID: PMC4538708.
18. Graham BS, Lynch DT. Burkitt Lymphoma. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2021.
19. Wilmore JR, Asito AS, Wei C, Piriou E, Sumba PO, Sanz I, et al. AID expression in peripheral blood of children living in a malaria holoendemic region is associated with changes in B cell subsets and Epstein-Barr virus. *Int J Cancer*. 2015; 136(6):1371–80. Epub 2014/08/08. <https://doi.org/10.1002/ijc.29127> PMID: 25099163; PubMed Central PMCID: PMC4697832.
20. Quintana MDP, Smith-Togobo C, Moormann A, Hviid L. Endemic Burkitt lymphoma—an aggressive childhood cancer linked to Plasmodium falciparum exposure, but not to exposure to other malaria parasites. *APMIS*. 2020; 128(2):129–35. Epub 2020/03/07. <https://doi.org/10.1111/apm.13018> PMID: 32133709.
21. Moormann AM, Chelimo K, Sumba PO, Tisch DJ, Rochford R, Kazura JW. Exposure to holoendemic malaria results in suppression of Epstein-Barr virus-specific T cell immunosurveillance in Kenyan children. *J Infect Dis*. 2007; 195(6):799–808. Epub 2007/02/15. <https://doi.org/10.1086/511984> PMID: 17299709.
22. Moss DJ, Burrows SR, Castelino DJ, Kane RG, Pope JH, Rickinson AB, et al. A comparison of Epstein-Barr virus-specific T-cell immunity in malaria-endemic and -nonendemic regions of Papua New Guinea. *Int J Cancer*. 1983; 31(6):727–32. Epub 1983/06/15. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910310609> PMID: 6305850.
23. Chattopadhyay PK, Chelimo K, Embury PB, Mulama DH, Sumba PO, Gostick E, et al. Holoendemic malaria exposure is associated with altered Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T-cell differentiation. *J Virol*. 2013; 87(3):1779–88. Epub 2012/11/24. <https://doi.org/10.1128/JVI.02158-12> PMID: 23175378; PubMed Central PMCID: PMC3554182.
24. Derkach A, Otim I, Pfeiffer RM, Onabajo OO, Legason ID, Nabalende H, et al. Associations between IgG reactivity to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) antigens and Burkitt lymphoma in Ghana and Uganda case-control studies. *EBioMedicine*. 2019; 39:358–68. Epub 2018/12/24. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.020> PMID: 30579868; PubMed Central PMCID: PMC6355394.
25. Wedderburn N, Davies DR, Mitchell GH, Desgranges C, de The G. Glomerulonephritis in common marmosets infected with Plasmodium brasilianum and Epstein-Barr virus. *J Infect Dis*. 1988; 158(4):789–94. Epub 1988/10/01. <https://doi.org/10.1093/infdis/158.4.789> PMID: 2844917.
26. WHO. World malaria report 2020. Report. Geneva: 2000 November 30. Report No.: SBN 978-92-4-001579-1
27. Ferreira MU, Nobrega de Sousa T, Rangel GW, Johansen IC, Corder RM, Ladeia-Andrade S, et al. Monitoring Plasmodium vivax resistance to antimalarials: Persisting challenges and future directions. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2020; 15:9–24. Epub 2020/12/29. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.12.001> PMID: 33360105; PubMed Central PMCID: PMC7770540.
28. De SL, Ntumngia FB, Nicholas J, Adams JH. Progress towards the development of a *P. vivax* vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2021:1–16. Epub 2021/01/23. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1880898> PMID: 33481638.
29. Kano FS, Sanchez BA, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, et al. Plasmodium vivax Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Health*. 2012; 17(8):989–1000. Epub 2012/05/31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2012.03016.x> PMID: 22643072.
30. Pires CV, Alves JRS, Lima BAS, Paula RB, Costa HL, Torres LM, et al. Blood-stage Plasmodium vivax antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. *PLoS One*. 2018; 13(11):e0207244. Epub 2018/11/13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207244> PMID: 30419071; PubMed Central PMCID: PMC6231651.
31. Medeiros CMP, Moreira EUM, Pires CV, Torres LM, Guimaraes LFF, Alves JRS, et al. Dynamics of IgM and IgG responses to the next generation of engineered Duffy binding protein II immunogen: Strain-

- specific and strain-transcending immune responses over a nine-year period. *PLoS One*. 2020; 15(5): e0232786. Epub 2020/05/08. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232786> PMID: 32379804; PubMed Central PMCID: PMC7205269.
32. Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. *Trends Parasitol*. 2008; 24(2):74–84. Epub 20080115. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.12.002> PMID: 18226584.
 33. Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med*. 1990; 172(1):379–82. <https://doi.org/10.1084/jem.172.1.379> PMID: 1694225; PubMed Central PMCID: PMC2188181.
 34. Wertheimer SP, Barnwell JW. Plasmodium vivax interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. *Exp Parasitol*. 1989; 69(4):340–50. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(89\)90083-0](https://doi.org/10.1016/0014-4894(89)90083-0) PMID: 2680568.
 35. Ceravolo IP, Sanchez BA, Sousa TN, Guerra BM, Soares IS, Braga EM, et al. Naturally acquired inhibitory antibodies to Plasmodium vivax Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. *Clin Exp Immunol*. 2009; 156(3):502–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.03931.x> PMID: 19438604; PubMed Central PMCID: PMC2691980.
 36. King CL, Michon P, Shakri AR, Marcotty A, Stanisic D, Zimmerman PA, et al. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage Plasmodium vivax infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(24):8363–8. Epub 20080603. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800371105> PMID: 18523022; PubMed Central PMCID: PMC2448842.
 37. Ntumngia FB, Pires CV, Barnes SJ, George MT, Thomson-Luque R, Kano FS, et al. An engineered vaccine of the Plasmodium vivax Duffy binding protein enhances induction of broadly neutralizing antibodies. *Sci Rep*. 2017; 7(1):13779. Epub 2017/10/25. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13891-2> PMID: 29062081; PubMed Central PMCID: PMC5653783.
 38. Smatti MK, Al-Sadeq DW, Ali NH, Pintus G, Abou-Saleh H, Nasrallah GK. Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front Oncol*. 2018; 8:211. Epub 20180613. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00211> PMID: 29951372; PubMed Central PMCID: PMC6008310.
 39. Kano FS, Souza-Silva FA, Torres LM, Lima BA, Sousa TN, Alves JR, et al. The Presence, Persistence and Functional Properties of Plasmodium vivax Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(12):e0005177. Epub 2016/12/14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005177> PMID: 27959918; PubMed Central PMCID: PMC5154503.
 40. Amaral LC, Robortella DR, Guimaraes LFF, Limongi JE, Fontes CJF, Pereira DB, et al. Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections. *Malar J*. 2019; 18(1):154. Epub 2019/05/02. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2781-3> PMID: 31039781; PubMed Central PMCID: PMC6492410.
 41. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 80(3):452–9. Epub 2009/03/10. PMID: 19270298.
 42. Fang XD, Kaslow DC, Adams JH, Miller LH. Cloning of the Plasmodium vivax Duffy receptor. *Mol Biochem Parasitol*. 1991; 44(1):125–32. Epub 1991/01/01. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90228-x](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90228-x) PMID: 1849231.
 43. Ntumngia FB, Adams JH. Design and immunogenicity of a novel synthetic antigen based on the ligand domain of the Plasmodium vivax duffy binding protein. *Clin Vaccine Immunol*. 2012; 19(1):30–6. Epub 2011/11/26. <https://doi.org/10.1128/CVI.05466-11> PMID: 22116684; PubMed Central PMCID: PMC3255949.
 44. Rodrigues MH, Cunha MG, Machado RL, Ferreira OC Jr., Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of Plasmodium vivax malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. *Malar J*. 2003; 2(1):39. Epub 20031114. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-2-39> PMID: 14617378; PubMed Central PMCID: PMC293434.
 45. Vicentin EC, Francoso KS, Rocha MV, Iourtov D, Dos Santos FL, Kubrusly FS, et al. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with Plasmodium vivax apical membrane antigen-1 expressed in Pichia pastoris yeast. *Infect Immun*. 2014; 82(3):1296–307. Epub 2014/01/01. <https://doi.org/10.1128/IAI.01169-13> PMID: 24379279; PubMed Central PMCID: PMC3958008.
 46. Fachiroh J, Paramita DK, Hariwiyanto B, Harijadi A, Dahlia HL, Indrasari SR, et al. Single-assay combination of Epstein-Barr Virus (EBV) EBNA1- and viral capsid antigen-p18-derived synthetic peptides for measuring anti-EBV immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody levels in sera from nasopharyngeal carcinoma patients: options for field screening. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(4):1459–67. Epub 2006/04/07. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1459-1467.2006> PMID: 16597877; PubMed Central PMCID: PMC1448657.

47. Piriou E, Kimmel R, Chelimo K, Middeldorp JM, Odada PS, Ploutz-Snyder R, et al. Serological evidence for long-term Epstein-Barr virus reactivation in children living in a holoendemic malaria region of Kenya. *J Med Virol.* 2009; 81(6):1088–93. Epub 2009/04/22. <https://doi.org/10.1002/jmv.21485> PMID: 19382256; PubMed Central PMCID: PMC3134942.
48. de Sanjose S, Bosch R, Schouten T, Verkuijlen S, Nieters A, Foretova L, et al. Epstein-Barr virus infection and risk of lymphoma: immunoblot analysis of antibody responses against EBV-related proteins in a large series of lymphoma subjects and matched controls. *Int J Cancer.* 2007; 121(8):1806–12. Epub 2007/06/09. <https://doi.org/10.1002/ijc.22857> PMID: 17557295.
49. Ogolla S, Daud, II, Asito AS, Sumba OP, Ouma C, Vulule J, et al. Reduced Transplacental Transfer of a Subset of Epstein-Barr Virus-Specific Antibodies to Neonates of Mothers Infected with *Plasmodium falciparum* Malaria during Pregnancy. *Clin Vaccine Immunol.* 2015; 22(11):1197–205. Epub 2015/09/18. <https://doi.org/10.1128/CVI.00270-15> PMID: 26376931; PubMed Central PMCID: PMC4622112.
50. Kimura H, Morita M, Yabuta Y, Kuzushima K, Kato K, Kojima S, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(1):132–6. Epub 1998/12/17. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.1.132-136.1999> PMID: 9854077; PubMed Central PMCID: PMC84187.
51. Piriou E, Asito AS, Sumba PO, Fiore N, Middeldorp JM, Moormann AM, et al. Early age at time of primary Epstein-Barr virus infection results in poorly controlled viral infection in infants from Western Kenya: clues to the etiology of endemic Burkitt lymphoma. *J Infect Dis.* 2012; 205(6):906–13. Epub 2012/02/04. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir872> PMID: 22301635; PubMed Central PMCID: PMC3282570.
52. Moormann AM, Chelimo K, Sumba OP, Lutzke ML, Ploutz-Snyder R, Newton D, et al. Exposure to holoendemic malaria results in elevated Epstein-Barr virus loads in children. *J Infect Dis.* 2005; 191(8):1233–8. Epub 2005/03/19. <https://doi.org/10.1086/428910> PMID: 15776368.
53. Monteiro TAF, Costa IB, Costa IB, Correa T, Coelho BMR, Silva AES, et al. Genotypes of Epstein-Barr virus (EBV1/EBV2) in individuals with infectious mononucleosis in the metropolitan area of Belem, Brazil, between 2005 and 2016. *Braz J Infect Dis.* 2020; 24(4):322–9. Epub 20200630. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.06.004> PMID: 32619403.
54. Ambrus JL, Ambrus CM. Burkitt's lymphoma. *J Med.* 1981; 12(6):385–413. PMID: 6274988.
55. Goncalves RM, Lima NF, Ferreira MU. Parasite virulence, co-infections and cytokine balance in malaria. *Pathog Glob Health.* 2014; 108(4):173–8. Epub 20140523. <https://doi.org/10.1179/2047773214Y.0000000139> PMID: 24854175; PubMed Central PMCID: PMC4069333.
56. Cruz LAB, Moraes MOA, Queiroga-Barros MR, Fukutani KF, Barral-Netto M, Andrade BB. Chronic hepatitis B virus infection drives changes in systemic immune activation profile in patients coinfecting with *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 13(6):e0007535. Epub 20190624. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007535> PMID: 31233500; PubMed Central PMCID: PMC6611654.
57. Del-Tejo PL, Cubas-Vega N, Caraballo-Guerra C, da Silva BM, da Silva Valente J, Sampaio VS, et al. Should we care about *Plasmodium vivax* and HIV co-infection? A systematic review and a cases series from the Brazilian Amazon. *Malar J.* 2021; 20(1):13. Epub 20210106. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03518-9> PMID: 33407474; PubMed Central PMCID: PMC7788992.
58. Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. *Adv Parasitol.* 2013; 81:77–131. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407826-0.00003-5> PMID: 23384622.
59. Cunha MG, Silva ES, Sepulveda N, Costa SP, Saboia TC, Guerreiro JF, et al. Serologically defined variations in malaria endemicity in Para state, Brazil. *PLoS One.* 2014; 9(11):e113357. Epub 20141124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113357> PMID: 25419900; PubMed Central PMCID: PMC4242530.
60. Yman V, White MT, Rono J, Arca B, Osier FH, Troye-Blomberg M, et al. Antibody acquisition models: A new tool for serological surveillance of malaria transmission intensity. *Sci Rep.* 2016; 6:19472. Epub 20160205. <https://doi.org/10.1038/srep19472> PMID: 26846726; PubMed Central PMCID: PMC4984902.
61. Idris ZM, Chan CW, Kongere J, Hall T, Logedi J, Gitaka J, et al. Naturally acquired antibody response to *Plasmodium falciparum* describes heterogeneity in transmission on islands in Lake Victoria. *Sci Rep.* 2017; 7(1):9123. Epub 20170822. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09585-4> PMID: 28831122; PubMed Central PMCID: PMC5567232.
62. Habib M, Buisson M, Lupo J, Agbalika F, Socie G, Germe R, et al. Lytic EBV infection investigated by detection of Soluble Epstein-Barr virus ZEBRA in the serum of patients with PTLD. *Sci Rep.* 2017; 7(1):10479. Epub 20170905. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09798-7> PMID: 28874674; PubMed Central PMCID: PMC5585268.
63. Aguilar R, Casabonne D, O'Callaghan-Gordo C, Vidal M, Campo JJ, Mutalima N, et al. Assessment of the Combined Effect of Epstein-Barr Virus and *Plasmodium falciparum* Infections on Endemic Burkitt

- Lymphoma Using a Multiplex Serological Approach. *Front Immunol.* 2017; 8:1284. Epub 20171026. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01284> PMID: 29123514; PubMed Central PMCID: PMC5662586.
64. Balfour HH Jr., Dunmire SK, Hogquist KA. Infectious mononucleosis. *Clin Transl Immunology.* 2015; 4(2):e33. Epub 20150227. <https://doi.org/10.1038/cti.2015.1> PMID: 25774295; PubMed Central PMCID: PMC4346501.
 65. Guerrero-Ramos A, Patel M, Kadakia K, Haque T. Performance of the architect EBV antibody panel for determination of Epstein-Barr virus infection stage in immunocompetent adolescents and young adults with clinical suspicion of infectious mononucleosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2014; 21(6):817–23. Epub 20140402. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.4.747-756.2001> PMID: 11427421; PubMed Central PMCID: PMC96137.
 66. Lang D, Vornhagen R, Rothe M, Hinderer W, Sonneborn HH, Plachter B. Cross-reactivity of Epstein-Barr virus-specific immunoglobulin M antibodies with cytomegalovirus antigens containing glycine homopolymers. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8(4):747–56. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.4.747-756.2001> PMID: 11427421; PubMed Central PMCID: PMC96137.
 67. Berth M, Bosmans E. Acute parvovirus B19 infection frequently causes false-positive results in Epstein-Barr virus- and herpes simplex virus-specific immunoglobulin M determinations done on the Liaison platform. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16(3):372–5. Epub 20081230. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.4.747-756.2001> PMID: 19116304; PubMed Central PMCID: PMC2650871.
 68. Tiguman GMB, Poll LB, Alves CEC, Pontes GS, Silva MT, Galvao TF. Seroprevalence of cytomegalovirus and its coinfection with Epstein-Barr virus in adult residents from Manaus: a population-based study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020; 53:e20190363. Epub 20200127. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0363-2019> PMID: 31994666; PubMed Central PMCID: PMC7083370.
 69. Nagata K, Kumata K, Nakayama Y, Satoh Y, Sugihara H, Hara S, et al. Epstein-Barr Virus Lytic Reactivation Activates B Cells Polyclonally and Induces Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression: A Mechanism Underlying Autoimmunity and Its Contribution to Graves' Disease. *Viral Immunol.* 2017; 30(3):240–9. Epub 20170323. <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0179> PMID: 28333576; PubMed Central PMCID: PMC5393416.
 70. Chen T, Song J, Liu H, Zheng H, Chen C. Positive Epstein-Barr virus detection in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients. *Sci Rep.* 2021; 11(1):10902. Epub 20210525. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90351-y> PMID: 34035353; PubMed Central PMCID: PMC8149409.
 71. Nakamura M, Burastero SE, Ueki Y, Larrick JW, Notkins AL, Casali P. Probing the normal and autoimmune B cell repertoire with Epstein-Barr virus. Frequency of B cells producing monoreactive high affinity autoantibodies in patients with Hashimoto's disease and systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1988; 141(12):4165–72. PMID: 2848890.
 72. Bohannon C, Powers R, Satyabhama L, Cui A, Tipton C, Michaeli M, et al. Long-lived antigen-induced IgM plasma cells demonstrate somatic mutations and contribute to long-term protection. *Nat Commun.* 2016; 7:11826. Epub 20160607. <https://doi.org/10.1038/ncomms11826> PMID: 27270306; PubMed Central PMCID: PMC4899631.
 73. Jones K, Savulescu AF, Brombacher F, Hadebe S. Immunoglobulin M in Health and Diseases: How Far Have We Come and What Next? *Front Immunol.* 2020; 11:595535. Epub 20201030. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.595535> PMID: 33193450; PubMed Central PMCID: PMC7662119.
 74. Chabay P, Lens D, Hassan R, Rodriguez Pinilla SM, Valvert Gamboa F, Rivera I, et al. Lymphotropic Viruses EBV, KSHV and HTLV in Latin America: Epidemiology and Associated Malignancies. A Literature-Based Study by the RIAL-CYTED. *Cancers (Basel).* 2020; 12(8). Epub 20200804. <https://doi.org/10.3390/cancers12082166> PMID: 32759793; PubMed Central PMCID: PMC7464376.
 75. Budiningsih I, Dachlan YP, Hadi U, Middeldorp JM. Quantitative cytokine level of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10, TGF-beta and circulating Epstein-Barr virus DNA load in individuals with acute Malaria due to *P. falciparum* or *P. vivax* or double infection in a Malaria endemic region in Indonesia. *PLoS One.* 2021; 16(12):e0261923. Epub 20211228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261923> PMID: 34962938; PubMed Central PMCID: PMC8714090.
 76. Gopal MR, Thomson BJ, Fox J, Tedder RS, Honess RW. Detection by PCR of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx of healthy adults and HIV-seropositives. *Lancet.* 1990; 335(8705):1598–9. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91433-b](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91433-b) PMID: 1972522.
 77. Ling PD, Lednicky JA, Keitel WA, Poston DG, White ZS, Peng R, et al. The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults: a 14-month longitudinal study. *J Infect Dis.* 2003; 187(10):1571–80. Epub 20030430. <https://doi.org/10.1086/374739> PMID: 12721937.
 78. Haque T, Crawford DH. PCR amplification is more sensitive than tissue culture methods for Epstein-Barr virus detection in clinical material. *J Gen Virol.* 1997; 78 (Pt 12):3357–60. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-12-3357> PMID: 9400988.

79. Autio A, Kettunen J, Nevalainen T, Kimura B, Hurme M. Herpesviruses and their genetic diversity in the blood virome of healthy individuals: effect of aging. *Immun Ageing*. 2022; 19(1):15. Epub 20220312. <https://doi.org/10.1186/s12979-022-00268-x> PMID: 35279192; PubMed Central PMCID: PMC8917371.
80. Munz C. Modification of EBV-Associated Pathologies and Immune Control by Coinfections. *Front Oncol*. 2021; 11:756480. Epub 20211028. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.756480> PMID: 34778072; PubMed Central PMCID: PMC8581224.