

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

**Estudo da resposta imune em primatas neotropicais na mata atlântica expostos à
infecção por *Plasmodium* sp.**

por

GABRIELA MAÍRA PEREIRA DE ASSIS

Belo Horizonte

2023

TESE D-IRR

G.M.P. ASSIS

2023

Gabriela Maíra Pereira de Assis

**Estudo da resposta imune em primatas neotropicais na mata atlântica expostos à
infecção por *Plasmodium* sp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título Doutor em Ciências da Saúde – área de concentração Doenças infecto-parasitárias e Crônicas não transmissíveis (DIP-DCNT)

Orientação: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Coorientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Belo Horizonte

2023

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

A76e Assis, Gabriela Máira Pereira de.
2023

Estudo da resposta imune em primatas neotropicais na mata atlântica expostos à infecção por *Plasmodium* sp. / Gabriela Máira Pereira de Assis. – Belo Horizonte, 2023

XIV, 154 f., il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 126-150

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: concentração Doenças infecto-parasitárias e Crônicas não transmissíveis.

1. Malária/transmissão. 2. Primatas Neotropicais/parasitologia. 3. Antígenos de Protozoários/isolamento & purificação. 4. Fatores Imunológicos/genética. I. Título. II. Brito, Cristiana Ferreira Alves de (Orientação). III. Carvalho, Luzia Helena (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.93

Gabriela Maíra Pereira de Assis

**Estudo da resposta imune em primatas neotropicais na mata atlântica expostos à
infecção por *Plasmodium* sp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título Doutor em Ciências da Saúde – área de concentração Doenças infecto-parasitárias e Crônicas não transmissíveis (DIP-DCNT)

Banca examinadora:

Prof. Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito (IRR/FIOCRUZ) Presidente

Prof. Dra. Letusa Albrecht (ICC/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Marina Galvão Bueno (IOC/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Josué da Costa Lima Junior (IOC/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Lílian Lacerda Bueno (ICB/UFMG) Titular

Dr. Pedro Augusto Carvalho Costa (ICB/UFMG) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 06 /03/2023

*A minha filha, a pessoa que me
mostrou o quão forte e frágeis somos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente o pai celestial por me guiar e proporcionar a oportunidade de poder evoluir nesse mundo de prova e expiação. E aos meus avós maternos e paternos que nesse plano e no outro me incentivaram a buscar cada vez mais conhecimento.

A Dra. Cristiana Brito, por me acolher em 2013 como sua aluna de iniciação científica sem nunca ter vivenciado o mundo científico. Foi um ano fantástico conhecendo um pouco biologia molecular e o DNA nas fezes dos macacos. Obrigada por todos os ensinamentos e conselhos profissionais e pessoais. Obrigada pela confiança em me aceitar novamente como aluna de doutorado. Você é um exemplo de mulher guerreira que nos mostra o quanto somos capazes. Obrigada por ser minha guia nesses anos todos.

A Dra. Luzia, por abrir as portas do seu laboratório e me acolher. Obrigada pelos ensinamentos e conselhos. Você é uma mulher de fibra que desbrava o mundo científico sem medo. Muito obrigada por ser um exemplo a ser seguido.

As Dras Flora e Taís, pesquisadoras únicas que a seus modos fazem grandes contribuições aos nossos projetos científicos. Obrigada pelo carinho, cuidado e conselhos.

Aos alunos de iniciação Mariana, Matheus, Luísa e Marina por todo auxílio nos experimentos e pela oportunidade de compartilhar um pouco de conhecimento.

Dra. Joseli (carinhosamente chamada de Lila) e Dr. Juan, por abrir as portas do seu laboratório e pelo compartilhamento de conhecimentos e experiências na bancada e na vida.

Aos nossos colaboradores do IOC, Dr. Claudio e Dra. Anielle por viabilizarem todas as coletas e suporte no projeto. Ao Dr. Pissinatti e Dra. Silvia pelo carinho e apoio nas coletas no CPRJ. A equipe da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte, em especial a coordenadora de mamíferos Valéria e ao veterinário Hernandes.

A equipe do Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial, Fundação Universidade Regional de Blumenau e programa de conservação do Bugio Ruivo. Em especial a Dra. Zelinda por mostrar o quão lindo é o amor pelos Bugios. Aos veterinários Júlio César, Amanda e Ana Julia pelo carinho e ensinamento nas coletas e nas horas de descontração. E aos demais membros Gustavo, Sheila e Aline. A querida aluna de iniciação da FURB, que foi uma companheira de trabalho nas madrugadas de separação de PBMC's.

Aos amigos do coração que a Fiocruz me proporcionou, Luiz e Michelle, “meu clichê favorito”, vocês foram e são a minha base nesse laboratório, obrigada pelas risadas, brincadeiras, discussões de resultados/artigos, ajudas nas análises estatísticas e apoio emocional. A minha companheira de uma década de ciência e madrinha, Denise Anete, uma profissional de excelência ímpar.

Aos alunos e amigos do laboratório, Madu, Samick, Carol, Yanka, Sofia, Mafe, Lucas, Gabi e Isabela, pelo compartilhamento diário das vivências e apoio nas dificuldades. As gestoras da qualidade do grupo Alice, Michaelis e Tatiana, por sempre estarem disponíveis. Ao técnico Geraldo pelas conversas diárias e brincadeiras por conta do Galo.

Gostaria de agradecer imensamente a Dra. Daniela Naback da plataforma de bioprospecção, por toda atenção, caminho e preocupação com os usuários da plataforma. Ao Eduardo Fernandes, por toda ajuda nas análises estatística. A Tiza da plataforma de Citometria de fluxo, pelo cuidado e carinho em ensinar como se manuseia o citômetro. Gostaria de agradecer a Dra. Maria Fernanda (carinhosamente chamada de MaFe) e ao Lucas pelos ensinamentos e ajuda na realização dos ensaios e análises de citometria.

Às agências de fomento, FAPEMIG, CNPq e FIOCRUZ, pelo apoio financeiro. "O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001. Em especial a CAPES pelo fornecimento da minha bolsa de doutorado e ao Programa de Mobilidade Acadêmica da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) por apoiar parte dos experimentos no Laboratório de Imunoparasitologia do Rio de Janeiro/RJ.

À minha base, minha filha Valentina, um pequeno ser humano tão desejado e amado, que chegou transformando o meu olhar para as coisas do dia a dia. Filha, você é a minha maior motivação para ser cada dia melhor. Obrigada por me escolher para guiá-la nesse plano. Ao meu companheiro e marido Pedro, obrigada pelo companheirismo, apoio e paciência nesses 15 anos de relacionamento. A minha mãe e meu irmão, meu trio de vida, minha base que me sustenta nesse plano terreno. Obrigada por me apoiar, aconselhar e cuidar. Ao meu pai, pelo apoio e incentivo nesta vida.

Aos meus familiares das famílias Pereira e Assis, muito obrigada pela compreensão da minha ausência, pela força e incentivo nos momentos de dificuldade. E principalmente, às adversidades que ocorreram ao longo da caminhada, elas nos fazem melhorar para enfrentar os próximos obstáculos.

RESUMO

A transmissão zoonótica é um grande desafio para o controle e eliminação da malária. A malária zoonótica já foi registrada na Mata Atlântica, na região extra-amazônica do Brasil, porém poucos estudos avaliaram a resposta imune dos primatas neotropicais (PN). Portanto, para entender melhor a resposta imune em diferentes hospedeiros e apoiar a identificação de potenciais reservatórios, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a resposta imune contra a malária em primatas neotropicais na Mata Atlântica brasileira. Amostras de 154 PN de três distintas áreas da Mata Atlântica foram utilizadas. Para caracterizar a resposta imune humoral dos animais, anticorpos IgM e IgG contra peptídeos da região repetitiva da *circumsporozoite protein* (CSP) de *Plasmodium vivax* (PvCSP), *Plasmodium brasilianum/Plasmodium malariae* (Pb/PmCSP), e *Plasmodium falciparum* (PfCSP) foram detectados por ELISA. Anticorpos contra os antígenos de *P. vivax* *Apical membrane antigen 1* (PvAMA-1), *Erythrocyte binding protein 2* (PvEBP-2), o domínio II da *Duffy binding protein* (PvDBPII) e *Merozoite surface protein 1₁₉* (PvMSP1₁₉) também foram avaliados. Anticorpos IgM contra MSP1₁₉ de *P. malariae* (PmMSP1₁₉) e de *P. falciparum* (PfMSP1₁₉) também foram detectados. Covariáveis, como sexo, idade, vida livre/cativeiro, PCR+ (infecção ativa) / PCR-, potencialmente associadas à resposta imune foram analisadas. Em relação a prevalência de anticorpos, 59% dos animais apresentam IgM e 85% IgG contra pelo menos um peptídeo de CSP. As soroprevalências contra pelo menos um antígeno eritrocitário de *P. vivax* foram 87% para IgM e 76% IgG. Níveis mais elevados de anticorpos IgM e IgG foram observados contra PvAMA-1 e PvEBP-2, respectivamente, em comparação com os outros antígenos. Covariáveis como idade, vida livre e infecção ativa foram significativamente associados com a soropositividade e níveis de anticorpos contra peptídeos de CSP e antígenos eritrocíticos. Todas as famílias de primatas neotropicais apresentaram anticorpos IgM e IgG contra peptídeos CSP, sendo a resposta de IgM mais evidente contra antígenos eritrocíticos. Entretanto, nem todas as famílias apresentaram IgG contra antígenos eritrocitários. Interessantemente, os animais que apresentaram IgM contra PvCSP e PvAMA-1 apresentam 5 vezes mais chances de serem PCR+, em comparação com aqueles animais que não respondem a essas proteínas. De forma inédita, esses achados demonstram uma alta prevalência de anticorpos naturalmente adquiridos contra repetições de CSP em todas as áreas estudadas, sugerindo uma intensa exposição a picadas de mosquitos infectados de todas as famílias de PN. No entanto, principalmente macacos da família Atelidae apresentaram anticorpos contra antígenos eritrocíticos de *P. vivax*,

sugerindo infecção sanguínea, o que pode sugerir que atuem como reservatórios potenciais de malária na Mata Atlântica. Alta soropositividade e níveis de anticorpos IgM contra antígenos sanguíneos foram observados com associação significativa com infecção ativa. Estes podem ser preditores de potenciais reservatórios de *Plasmodium* entre primatas neotropicais na Mata Atlântica brasileira.

Palavras-Chave: Malária, Primatas Neotropicais, Mata Atlântica, resposta imune, IgM, IgG, antígenos pré-eritrocíticos, antígenos eritrocíticos.

ABSTRACT

Zoonotic transmission is a major challenge for malaria control and elimination. Zoonotic malaria has already been recorded in the Atlantic Forest, in the extra-Amazonian region of Brazil, but few studies have evaluated the immune response of neotropical primates (NP). Therefore, to better understand the immune response in different hosts and support the identification of potential reservoirs, the present study aimed to characterize the immune response against malaria in neotropical primates in the Brazilian Atlantic Forest. Samples of 154 NP from three different areas of the Atlantic Forest were used. To characterize the humoral immune response of the animals, IgM and IgG antibodies against peptides from the repetitive region of the circumsporozoite protein (CSP) of *Plasmodium vivax* (PvCSP), *Plasmodium brasilianum/Plasmodium malariae* (Pb/PmCSP), and *Plasmodium falciparum* (PfCSP) were detected by ELISA. Antibodies against Apical membrane antigen 1 (PvAMA-1), Erythrocyte binding protein 2 (PvEBP-2), domain II of Duffy binding protein (PvDBPII) and Merozoite surface protein 1₁₉ (PvMSP1₁₉) were also evaluated. Additionally, IgM antibodies against *P. malariae* MSP1₁₉ (PmMSP1₁₉) and *P. falciparum* (PfMSP1₁₉) were also detected. Covariates potentially associated with the immune response, such as sex, age, free-living/captive, PCR+ (active infection)/ PCR-, were analyzed. Regarding the prevalence of antibodies, 59% of the animals had IgM and 85% IgG against at least one CSP peptide. Seroprevalences against at least one *P. vivax* erythrocyte antigen were 87% for IgM and 76% for IgG. Higher levels of IgM and IgG antibodies were observed against PvAMA-1 and PvEBP-2, respectively, compared to other antigens. Covariates such as age, free-living and active infection were significantly associated with seropositivity and antibody levels against CSP peptides and erythrocytic antigens. All NP families showed IgM and IgG antibodies against CSP peptides, with the most prominent IgM response against erythrocytic antigens. However, not all families had IgG against erythrocyte antigens. Interestingly, animals that presented IgM against PvCSP and PvAMA-1 were almost 5 times more likely to have an active infection, compared to animals that did not respond to these proteins. Unprecedentedly, these findings demonstrate a high prevalence of naturally acquired antibodies against CSP repeats in all areas studied, suggesting intense exposure to bites from infected mosquitoes from all NP families. However, mainly monkeys of the Atelidae family showed antibodies against erythrocytic antigens of *P. vivax*, suggesting blood infection, which may suggest that they act as potential reservoirs of malaria in the Atlantic Forest. High seropositivity and levels of IgM antibodies against blood antigens

were observed with significant association with active infection. These may be predictors of potential *Plasmodium* reservoirs among Neotropical primates in the Brazilian Atlantic Forest.

Keywords: Malaria, Neotropical Primates, Atlantic Forest, immune response, IgM, IgG, pre-erythrocytic antigens, erythrocytic antigens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa da incidência de casos de malária (casos por 1000 habitantes) por país, 2020. A) Número de casos de infecções por <i>P. falciparum</i> a cada 1000 habitantes. B) Número de casos de infecções por <i>P. vivax</i> a cada 1000 habitantes.....	16
Figura 2- Casos confirmados de Malária por 1000 habitantes nas regiões das Américas em 2021.....	17
Figura 3- Mapa de risco de malária por município de infecção no Brasil em 2021...	18
Figura 4 - Representação esquemática do ciclo biológico do plasmódio no hospedeiro humano e no vetor Anopheles.....	21
Figura 5- Principais antígenos de <i>Plasmodium</i> sp. em diferentes estágios do ciclo de vida.....	22
Figura 6- Mapa do Brasil com biomas e número de casos de malária na região extra-amazônica de 2007 a 2017.....	34
Figura 7 - Esquema hipotético de transmissão da malária como zoonose em regiões de Mata Atlântica.....	36
Figura 8- Localização do CEPESBI e matas ao seu redor.....	48
Figura 9 <i>Alouatta guariba clamitans</i> de cativeiro do Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial (CEPESBI), Indaial, SC.....	49
Figura 10- Localização do fragmento de floresta e local onde foram capturados os <i>Alouatta guariba clamitans</i> de vida livre, na cidade de Joinville, Santa Catarina, Sul do Brasil.....	54
Figura 11 - Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ): localização, seus cativeiros e alguns exemplares de primatas neotropicais.....	57
Figura 12 - Estratégia de análise por citometria de fluxo para fenotipagem de subpopulações de células T.....	69
Figura 13 - Subpopulações de células T em primatas neotropicais não-expostos e expostos ao <i>Plasmodium</i> sp.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das amostras obtidas dos <i>Alouatta guariba clamitans</i> de cativeiro do CEPESBI, Indaial, Santa Catarina.....	50
Tabela 2 - Descrição das amostras obtidas dos bugios de vida livre capturados no estado de Santa Catarina.....	53
Tabela 3 - Descrição das amostras de <i>Alouatta guariba clamitans</i> de vida livre capturados na cidade de Joinville, Santa Catarina.....	55
Tabela 4 - Descrição das amostras obtidas dos primatas neotropicais de cativeiro CPRJ, Guapimirim, RJ.....	58
Tabela 5 - Descrição das amostras obtidas dos primatas neotropicais de cativeiro FPMZ, Belo Horizonte, MG.....	60
Tabela 6 - Iniciadores utilizados no estudo.....	64
Tabela 7 – Comparação da média de viabilidade das células totais de duas espécies de PNH em diferentes regiões antes da mudança do protocolo e após.....	119
Tabela 8 - Comparação da média de viabilidade das células T totais (CD3+) de duas espécies de PNH em diferentes regiões antes da mudança do protocolo e após.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT - Alanina aminotransferase

AMA-1 - *Apical Membrane Antigen-1* - Antígeno 1 da Membrana Apical

BIAbs - *Binding Inhibitory Antibodies* - Anticorpos inibitórios

CEPESBI - Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial

CPRJ - Centro de Primatologia do Rio de Janeiro

CSP - *Circumsporozoite protein* - Proteína Circumsporozoíta

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*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EBP-2 - *Erythrocyte binding protein 2* – Proteína de ligação no eritrócito.

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – Ensaio de imunoabsorção enzimática

IFA - Imunofluorescência indireta

IFN- γ – interferon-gama

IgG - Imunoglobulinas G

IgM - Imunoglobulinas M

IL-12 – Interleucina 12

IL-4 – Interleucina 4

LVCs - lâminas de verificação de cura

MS – Mistério da Saúde

MSP - *Merozoite surface protein* - Proteína de superfície do merozoíto

MSP-1 - Proteína 1 de superfície da merozoíto

NESTED-PCR – Reação em cadeia da polimerase com dois passos de amplificação

OMS – Organização Mundial da Saúde

pb – pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PfCSP - CSP de *Plasmodium falciparum*

PN – Primatas neotropicais

PNH – Primatas Não-Humanos

PvAMA-1 – AMA-1 de *P. vivax*

PvCSP - CSP de *P. vivax*

PvDBP – DBP de *P. vivax*

PvMSP-1 – MSP-1 de *P. vivax*

RON - *rhoptry neck protein* - Proteína de roptria

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVS – Sistema de Vigilância em Saúde

TNF- α - Factor de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Malária no Mundo e no Brasil	15
1.2 Ciclo biológico do Plasmódio.....	18
1.3 Principais antígenos candidatos vacinais do <i>Plasmodium</i>	21
1.3.1 Antígeno pré-eritrocítico: CSP.....	22
1.3.2 Antígenos eritrocíticos: AMA-1, DBPIL, EBP2 e MSP1 ₁₉	24
1.4 Resposta imune naturalmente adquirida contra malária	26
1.5 Malária extra-Amazônica e de Mata Atlântica	33
1.6 Malária em Primatas Não-humanos.....	37
1.7 Primatas não-humanos como modelos para o estudo da malária	40
1.8 Resposta imune anti-malárica em Primatas Neotropicais naturalmente expostos ao <i>Plasmodium</i> sp.	43
1.9 Resposta imune celular anti-malárica em Primatas Não-Humanos	44
1.10 Curso da Infecção Natural de <i>Plasmodium</i> em Primatas Neotropicais	44
2. JUSTIFICATIVA.....	46
3. OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos específicos	47
4. METODOLOGIA	48
4.1 Descrição das áreas de estudo em Santa Catarina	48
4.1.1 Indaial.....	48
4.1.2 Joinville	53
4.4 Amostras de Primatas Neotropicais	56
4.2 Descrição da área de estudo no Rio de Janeiro.....	56
4.3 Descrição da área controle de estudo no estado de Minas Gerais	59
4.5 Extração de DNA	61
4.6 Diagnóstico molecular: reação em cadeia da polimerase (PCR).....	61
4.6.1 Nested-PCR.....	61
4.6.2 Nested PCR/RFLP.....	62
4.6.3 Controles das reações de PCR e iniciadores utilizados	63
4.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando peptídeos sintéticos da Proteína Circunsporozoíta (CSP) de <i>Plasmodium</i> sp.....	64

4.8 Ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando os antígenos da fase sanguínea	65
4.9 Processamento das amostras de sangue: obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	67
4.10 Descongelamento e imunofenotipagem de células T.....	67
4.11 Análise dos dados.....	71
5. RESULTADOS.....	72
5.1 Artigo 1.....	72
5.2 Artigo 2.....	93
5.3 Padronização da imunofenotipagem de Células T de Primatas Neotropicais naturalmente exposto ao <i>Plasmodium</i> sp.....	118
6. DISCUSSÃO	121
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	123
8. CONCLUSÃO	125
9. REFERÊNCIAS.....	126
ANEXOS	151
I. COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO	151
II. AUTORIZAÇÕES DO SISBIO.....	152

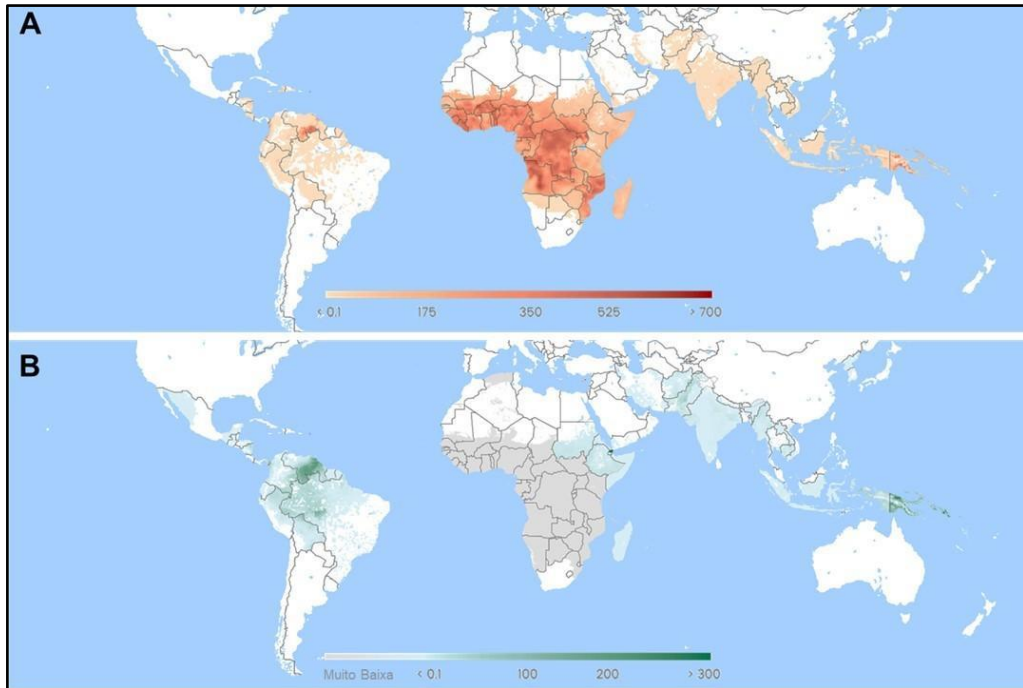
1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária no Mundo e no Brasil

A malária é um importante problema de saúde pública. A doença é causada pelo protozoário intracelular pertencente ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*, sendo transmitida a seus hospedeiros vertebrados através da picada de mosquitos do gênero *Anopheles*. A doença é endêmica em 84 países das regiões tropicais e subtropicais do planeta (Figura 1). De acordo com a última estimativa da Organização Mundial da Saúde, 247 milhões de casos de malária humana e 619.000 mortes foram registradas em 2021 (World Malaria Report, 2022). Sendo reportado um aumento de 2 milhões de casos, comparado a 2020. Esse aumento na incidência está associado à interrupção de serviços essenciais ao combate à malária durante a pandemia de COVID-19 (World Malaria Report, 2022).

Atualmente cinco espécies de *Plasmodium* frequentemente causam malária em humanos: *Plasmodium vivax* (Grassi & Felitti, 1890), *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1992) e *Plasmodium knowlesi* (Sinton & Mulligan, 1932), sendo esta última recentemente descrita em uma transmissão zoonótica generalizada no sudeste da Ásia (Cox-Singh & Singh, 2008; White *et al.*, 2008; Cox-Singh, 2012). *Plasmodium falciparum* é a espécie mais letal, enquanto *P. vivax* é a espécie mais prevalente fora do continente Africano (Lover *et al.*, 2018; WHO, 2022).

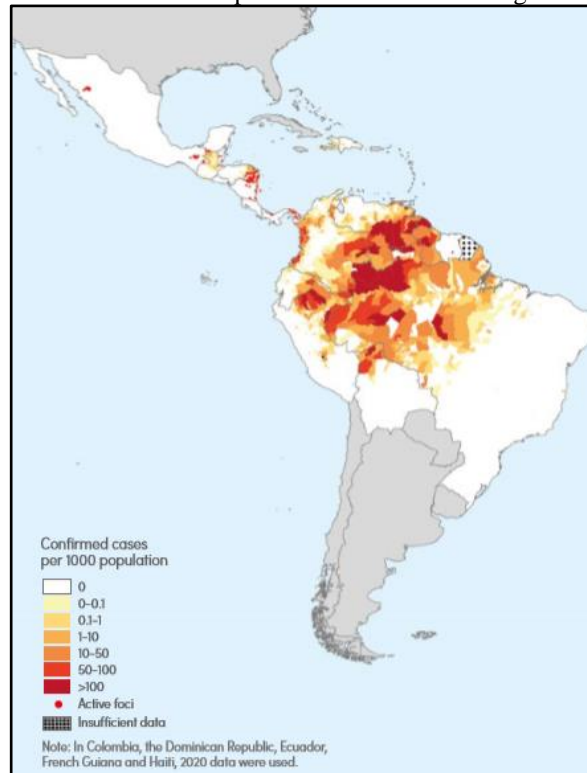
Figura 1- Mapa da incidência de casos de malária (casos por 1000 habitantes) por país, 2020.



Legenda: **A)** Em diferentes tons de vermelho estão representados os números de casos de infecções por *P. falciparum* a cada 1000 habitantes. **B)** Em diferentes tons de verde estão representados os números de casos de infecções por *P. vivax* a cada 1000 habitantes. **Fonte:** Adaptado de The Malaria Atlas Project, 2023. Disponível em: <https://malariaatlas.org>.

Na América, cerca de 142 milhões de pessoas em 18 países estão sob risco de infecção malárica, onde quase 76% das infecções são causadas por *Plasmodium vivax*. Três países – Brasil (27%), Colômbia (17%) e Venezuela (República Bolivariana da Venezuela) (34%) – respondem por 75% de todos os casos estimados (Figura 2) (World Malaria Report, 2022). No ano de 2021 foram registrados 597.000 casos de malária e 334 mortes nas Américas (World Malaria Report, 2022).

Figura 2- Casos confirmados de Malária por 1000 habitantes nas regiões das Américas em 2021

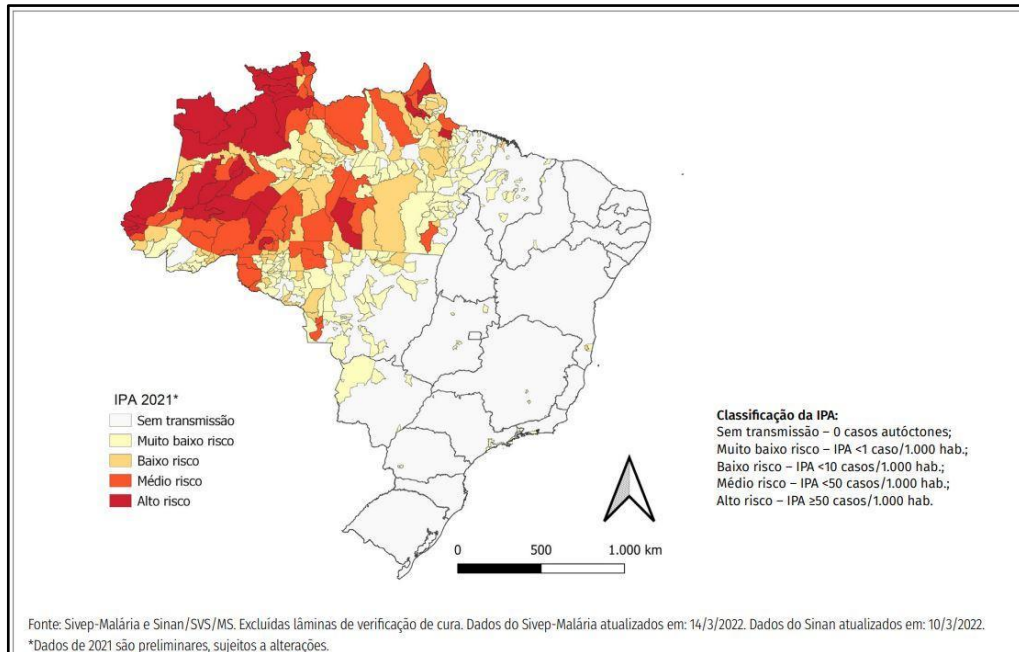


Legenda: Em diferentes tons de vermelho estão representados a distribuição de casos confirmados de malária por 1000 habitantes nas regiões das Américas. **Fonte:** World Malaria Report, 2022.

No Brasil a doença é endêmica na região da Amazônia legal, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (SVS/MS 2022). No ano de 2021 foram registrados 157.457 casos, as espécies mais prevalentes foram *P. vivax* (83%), *P. falciparum* (17%) e *P. malariae* (< 1%) (SVS/MS, 2022 a) (Figura 3). A região Amazônica tem mais de 99% dos casos da malária do país e a região extra-amazônica, composta por 17 estados e o Distrito Federal, é responsável por menos que 1% do total de casos notificados no país (SVS/MS, 2022 b). Sendo registrados casos importados da região Amazônica ou países da América Latina e continente Africano e Asiático, casos introduzidos e autóctones (Costa *et al.*, 2010; Brasil *et al.*, 2013; de Pina-Costa *et al.*, 2014; SVS/MS, 2022 b).

Entre os anos de 2012 e 2017 foram registrados 3.797 casos na região extra-amazônica (Braz *et al.*, 2020). Apesar do número pequeno de casos, a doença não pode ser negligenciada nesta região, pois o atraso no diagnóstico e no tratamento pode levar ao agravamento da doença e até ao óbito do paciente. No ano de 2019, a letalidade da doença na região extra-amazônica foi de aproximadamente 2,04%, enquanto na região amazônica foi de aproximadamente 0,02%. Demonstrando que a doença é 123 vezes mais letal em áreas não endêmicas (SVS/MS, 2020).

Figura 3- Mapa de risco de malária por município de infecção no Brasil em 2021



Legenda: O risco é estimado a partir da Incidência Parasitária Anual (IPA), número de diagnósticos positivos para malária por 1000 habitantes, em uma determinada área, no período de um ano. Baseado no IPA, o risco é dividido entre baixo (IPA < 10 casos/mil habitantes), médio (IPA entre 10 e 49 casos/mil habitantes) e alto (IPA ≥ 50 casos/mil habitantes). **Fonte:** SVS/MS, 2022a

No ano de 2022, o Ministério da Saúde emitiu um boletim com um compilado dos casos de malária na região extra-amazônica brasileira entre os anos de 2010 e 2021, demonstrando que foram realizadas 37.749 notificações nesse período, sendo 22,0% (8.317) dos casos positivos, 66,0% (24.899) dos casos negativos, 9,6% (3.618) foram notificadas como lâminas de verificação de cura (LVCs) e 2,4% (915) foram notificações nulas (SVS/MS, 2022 b).

1.2 Ciclo biológico do Plasmódio

Os plasmódios possuem um ciclo biológico complexo, necessitando da participação de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado. A fase de reprodução sexuada do parasito ocorre no hospedeiro invertebrado, enquanto a fase assexuada ocorre no hospedeiro vertebrado (Figura 4).

O ciclo se inicia quando a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* inocula os esporozoítos, forma infectantes do parasito, na derme do hospedeiro durante o repasto sanguíneo (Amino *et al.*, 2006). No Brasil, o principal vetor da malária é o mosquito *Anopheles darlingi*, cujos criadouros preferenciais são coleções de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo, muito frequentes na Amazônia (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010; SVS/MS, 2020). Os esporozoítos migram pelo tecido subcutâneo, podendo alcançar o sistema linfático, acredita-se que essa rota

possa ser importante para estimular o sistema imune (Amino *et al.*, 2006). Os parasitos que escapam do sistema imune, atingem a circulação sanguínea e migram para o fígado.

No fígado, o parasito tem a capacidade de se deslocar através dos hepatócitos e, posteriormente, se instalar e se desenvolver em uma das células hepáticas (Mota *et al.*, 2011). Durante o ciclo hepático, *P. vivax* e *P. ovale*, podem desenvolver formas dormentes, denominadas hipnozoítos, que são responsáveis pelas recaídas que ocorrem meses ou anos após a infecção inicial (Coatney, 1976; Krotoski, 1985; 1989; White *et al.*, 2011).

Nos hepatócitos, os esporozoítos se diferenciam e multiplicam assexuadamente (esquizogonia) dando origem aos merozoítos, que são liberados na corrente sanguínea por meio de vesículas denominadas merossomos, repletos de merozoítos (Sturm *et al.*, 2006). Ao cair na circulação sanguínea, os merozoítos penetram nos eritrócitos, dando início à fase eritrocítica do ciclo, responsável pela sintomatologia clínica da doença.

O processo de invasão dos eritrócitos pelos merozoítos é dependente de inúmeras interações específicas entre proteínas de superfície do parasito e receptores na superfície dos eritrócitos (Petter & Duffy, 2015). As interações para a invasão variam de acordo com a espécie de *Plasmodium*, para *P. falciparum* foram descritas várias moléculas principais envolvidas nesse processo (Satchweell, 2016), mas, até o momento, uma única via de invasão foi descrita para *P. vivax* (Adams *et al.*, 1990), envolvendo antígeno do grupo sanguíneo Duffy receptor para quimiocinas - *Duffy antigen/chemokine* for receptor, DARC - e a proteína de micronema do parasito, *Duffy binding protein* (DBP) (Miller *et al.*, 1976; Adams *et al.*, 1992). Recentemente, a proteína de ligação aos eritrócitos 2 - *Erythrocyte binding protein 2* (EBP-2) de *P. vivax* foi sugerida como um novo ligante para uma potencial via alternativa de invasão de reticulócitos Duffy positivos (Hester *et al.*, 2013; Ntumngia *et al.*, 2016).

Uma vez nos eritrócitos os merozoítos se diferenciam em trofozoítos imaturos, maduros e por fim esquizontes. Os esquizontes geram merozoítos que, por sua vez, penetram em outros eritrócitos, reiniciando o ciclo eritrocítico (Crompton *et al.*, 2014). Esse processo de lise dos eritrócitos ocasionam o quadro de inflamação dando origem ao aparecimento dos sintomas clínicos da malária, como febre, calafrios, dor de cabeça, náuseas e fraqueza.

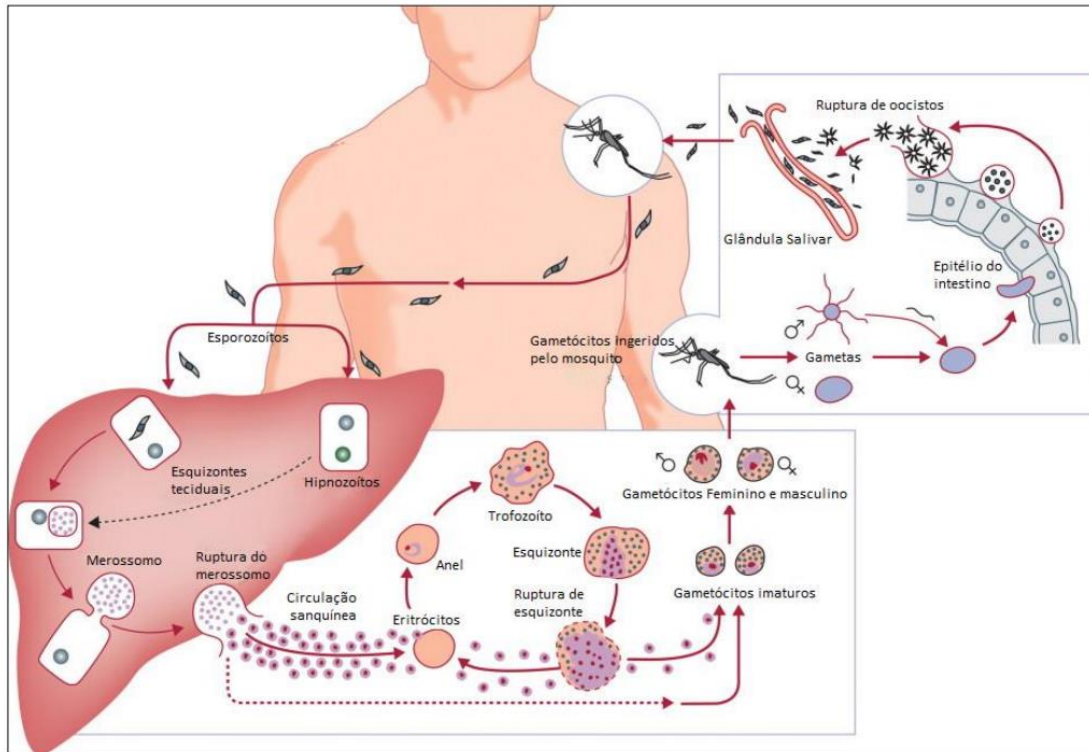
Recentemente um novo achado sobre a biologia de *Plasmodium* vem ganhando destaque, a demonstração que a medula óssea pode atuar como nicho hematopoiético para *Plasmodium* (Obaldia *et al.*, 2018). Atuando como um reservatório do parasito e local de desenvolvimento e proliferação de gametócitos (Joice *et al.*, 2014; Mayor *et al.*, 2015; Mallert *et al.*, 2015; Obaldia *et al.*, 2018). Além disso, alguns autores sugerem a medula óssea como um nicho onde pode ocorrer a invasão do *P. vivax* antes de reentrar na circulação, uma vez que os merozoítos

infectam preferencialmente reticulócitos jovens (CD71⁺), restritos à medula (Mallert *et al.*, 2015; Obaldia *et al.*, 2018; Silva-Filho *et al.*, 2020).

Após algumas gerações de merozoítos sanguíneos, alguns deles se diferenciam nas formas sexuais do parasito, os macrogametócitos (feminino) e os microgametócitos (masculinos) (Coatney *et al.*, 1971). Vale destacar que *P. vivax* continuamente produz gametócitos no início do ciclo eritrócito, sendo esse um dos motivos da sua alta transmissão (Muller *et al.*, 2009). Estas formas sexuais são ingeridas pelo mosquito do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo dando início à fase sexuada do ciclo, que ocorre no interior do hospedeiro invertebrado (Sinden, 1983).

No trato digestivo do mosquito, os gametócitos se diferenciam em gametas masculinos e femininos, e dão origem ao zigoto (Vlachou *et al.*, 2006). Quando o zigoto se desloca em movimentos amebóides, ele é denominado oocineto e, por um mecanismo trans-celular, atinge a camada de células epiteliais do intestino médio onde se aloja entre o epitélio e a membrana basal e passa então a ser denominado oocisto (Zieler & Dvorak, 2000; Baton & Ranford-Cartwright, 2004; Vlachou *et al.*, 2004). A maquinaria de replicação de DNA e de síntese de proteínas está ativada no oocisto permitindo a multiplicação assexuada dos parasitos, e a produção de milhares de esporozoítos. Os esporozoítos, por sua vez invadem a hemolinfa do inseto e muitos conseguem invadir as glândulas salivares, podendo, num novo repasto sanguíneo, serem inoculados no hospedeiro vertebrado, completando assim o ciclo biológico dos plasmódios (Crompton *et al.*, 2014; Meibalan & Marti, 2017).

Figura 4 - Representação esquemática do ciclo biológico do plasmódio no hospedeiro humano e no vetor Anopheles

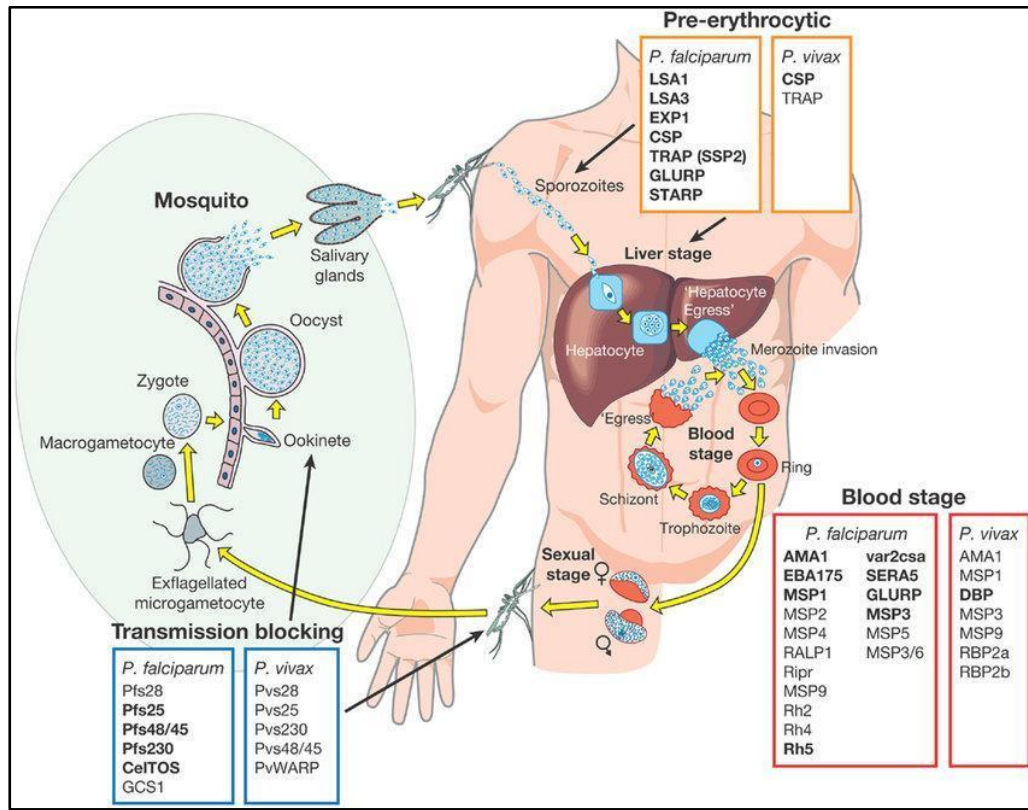


Legenda: Uma vez que os esporozoítos infecciosos são inoculados na pele pelos mosquitos anófeles fêmeas, eles atingem a corrente sanguínea e entram nos hepatócitos iniciando o estágio exoeritrocítico. Dentro do fígado, o *Plasmodium sp.* pode: i) se diferenciar em esquizontes teciduais, que após milhares de replicações mitóticas em hepatócitos individuais liberam merozoítos na corrente sanguínea, ou especificamente o *P. vivax* ii) se diferenciar em um estágio dormente chamado hipnozoíto que, após ativação após meses ou anos, sofrem recaídas e iniciam o ciclo eritrocítico. Durante os estágios eritrocíticos, os merozoítos do *Plasmodium sp.* invadem os reticulócitos e o processo de desenvolvimento cíclico leva cerca de 48-72 h. Além disso, alguns parasitos podem se diferenciar em gametócitos maduros antes da doença clínica e se desenvolve, tendo assim a vantagem de transmissão contínua ao inseto vetor antes do aparecimento de sintomas clínicos e posterior tratamento. Os gametócitos circulantes ao serem absorvidos pela refeição sanguínea dos mosquitos anófeles, iniciam o ciclo sexual, que inclui a liberação dos gametas masculino e feminino, a fertilização e a formação de um oocineto móvel que atravessa o epitélio do intestino médio. A diferenciação em uma nova forma replicativa, conhecida como oocisto, liberação de esporozoítos, migração e invasão das glândulas salivares encerra o ciclo de vida no vetor. Os esporozoítos estão prontos para serem inoculados no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do vetor e dar continuidade ao ciclo. **Fonte:** Modificado, Muller *et al.*, 2009.

1.3 Principais antígenos candidatos vacinais do *Plasmodium*

Diante da complexidade do ciclo biológico do *Plasmodium*, uma série de proteínas/antígenos presentes em diferentes fases do ciclo de vida vem sendo utilizadas no estudo da resposta imune na malária (figura 5).

Figura 5- Principais antígenos candidatos à vacina contra *Plasmodium* sp. baseados em diferentes estágios do ciclo de vida.



Legenda: São mostrados antígenos candidatos à vacina contra a malária. Todos os antigênicos candidatos para *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* são sobrepostos ao ciclo de vida do Plasmodio, para indicar a categoria de vacina contra a malária que está a ser desenvolvida e a fase do ciclo de vida visada. Os antígenos indicados a negrito são aqueles que estão atualmente a ser avaliados em ensaios pré-clínicos ou que entraram pelo menos em ensaios clínicos de Fase 1, de acordo com as tabelas arco-íris da vacina contra a malária da OMS (WHO, 2013). Os estágios latentes do *P. vivax* conhecidos como “hiponozoítos” não são mostrados, mas ocorrem no estágio hepático. **FONTE:** Barry e Arnott *et al.*, 2014.

1.3.1 Antígeno pré-eritrocítico: CSP

A proteína circunsporozoíta ou CSP (*Circumsporozoite protein*) é a principal proteína de superfície dos esporozoítos de *Plasmodium* sp., estando diretamente envolvida no processo de invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos, através da ligação de proteoglicanos de heparina sulfato encontrados na superfície do hepatócito com a CSP do parasito (Sinnis, Sim, 1997; Zaheri *et al.*, 2006; Coppi *et al.*, 2011). A proteína possui cerca de 58 kDa e estudos têm mostrado que as sequências de CSP incluem uma região central variável de sequências de aminoácidos repetidas e uma região I e II totalmente conservada (N e C-terminal) (Arnot *et al.*, 1985; Rosenberg *et al.*, 1989).

Todas as espécies de *Plasmodium* contêm na região central sequências repetições de aminoácidos específicas de cada espécie (Mueller *et al.*, 2010), que têm como alvo receptores do hospedeiro. Além disso, essas sequências induzem uma forte resposta imune humoral e

celular, pois contêm epítomos imunodominantes de células B que estão entre os principais candidatos à vacina da malária (Migot *et al.*, 1993; Capila e Linhardt, 2002; Singh *et al.*, 2007).

Com base nas regiões repetitivas centrais de repetição da CSP de *P. vivax*, foram identificadas três 3 variantes (VK210, VK247 e *P. vivax-like*) (ARNOT *et al.*, 1958; ROSENBERG *et al.*, 1989; QARI *et al.*, 1993). A variante VK210, foi a primeira caracterizada e apresenta o nonapeptídeo GDRA(A/D)GQPA, sendo considerada a forma clássica (Arnot *et al.*, 1985). A variante VK247, foi isolada na Tailândia por Rosenberg e colaboradores (1989), apresentando variações no nonapeptídeo, ANGA(G/D)(N/D)QPG. Posteriormente, na Papua Nova Guiné, foi descrita a existência de uma terceira variante denominada *Plasmodium vivax-like* (*P. vivax-like*) (APGANQ(E/G)GGAA), cuja sequência da porção repetitiva da CSP possui homologia com a de *Plasmodium simiovale*, um parasito da malária de PNH, originalmente encontrado em *Macaca sinica*, no Sri Lanka (Qari *et al.*, 1993). No Brasil a variante VK 210 é a mais prevalente, seguido pela VK 247 e *P. vivax-like* (Storti-Melo *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2019).

Goldman e colaboradores (1993) descreveram uma alta similaridade genética na região de repetição de CSP entre as variantes VK210 e VK247 de *P. vivax* e o CSP de *P. simium*. Além de demonstrar que anticorpos monoclonais que reconhecem a variante VK210 de *P. vivax* também reconhecem os esporozoítos de *P. simium* (Goldman *et al.*, 1993). O mesmo teste foi realizado utilizando anticorpos monoclonais que reconhecem a região de repetição da variante VK247, porém não foi observado reatividade com o esporozoíto de *P. simium*, os autores justificaram esse achado pelo baixo número de sequências/sequencias/ população de parasitos analisadas no estudo.

Em *P. falciparum* essa região central contém a repetição NANP/NVDP e em *P. malariae* a repetição NAAG/NDAG (Wang *et al.*, 2020; Saralamba *et al.*, 2018). Na literatura já se tem demonstrado que *P. malariae* e *P. brasilianum* compartilham sequências de repetição de CSP idênticas e não sendo possível segregar as espécies (Guimarães *et al.*, 2012). Além disso, já foi demonstrado que os mesmos anticorpos monoclonais reconhecem a CSP dessas duas espécies, demonstrando a similaridade imunogênica entre elas (Cochrane, Collins; Nussenzweig, 1984; Cochrane *et al.*, 1958; Fandeur *et al.*, 2000).

1.3.2 Antígenos eritrocíticos: AMA-1, DBPII, EBP2 e MSP1₁₉

O Antígeno 1 da Membrana Apical (*Apical Membrane Antigen-1* -, AMA-1) localizada no micronema do parasito, participa na orientação e estabelecimento do contato entre a região apical do parasito e a célula hospedeira, culminando na formação da junção móvel (Mitchelli *et al.*, 2004). Já foi demonstrado que AMA-1 é necessário para a invasão de eritrócitos em várias espécies de *Plasmodium* (Triglia *et al.*, 2000; Kato *et al.*, 2005). A proteína de 66 kDa foi identificada pela primeira vez como proteína de *P. knowlesi* e seu (Thomas *et al.*, 1984). O gene foi então clonado e verificou-se ser bastante conservado em *P. falciparum* (Thomas *et al.*, 1984; Waters *et al.*, 1990). A proteína AMA-1 é altamente imunogênica, protegendo contra a infecção por *Plasmodium chabaudi* em camundongos (Crewther *et al.*, 1996) e exibindo níveis significativos de anticorpos em populações humanas de áreas endêmicas (ThomaS *et al.*, 1994; Wickramarachchi *et al.*, 2006; Bueno *et al.*, 2008). A proteína AMA-1 é um candidato vacinal específico de vários estágios do ciclo de vida do parasito, importante nos processos de invasão de células hospedeiras pelos esporozoítos (Kale *et al.*, 2019; Gentil *et al.*, 2010; Vicentin *et al.*, 2014) e merozoítos (Gentil *et al.*, 2010; Vicentin *et al.*, 2014; Fonseca *et al.*, 2016). AMA-1 é um ligante de apicomplexa altamente conservado que é sequestrado no micronema até que a invasão seja iniciada (Triglia *et al.*, 2000). A proteína atua em conjunto com as proteínas do complexo da proteína *rhoptry neck protein* (RON), principalmente RON2, para formar uma junção estreita essencial para a invasão (Srinivasan *et al.*, 2011).

A proteína de superfície do merozoíto (*Merozoite surface protein* - MSP), faz parte de uma família constituída por dez proteínas MSP-1, MSP-3 α , MSP-3 β , MSP-3 γ , MSP-4, MSP-5, MSP-6, MSP-7, MSP-8 e MSP-9 (Espinosa *et al.*, 2003). A proteína 1 de superfície da merozoíto (MSP-1) tem sido a mais intensamente estudada por ser a proteína principal que está presente na superfície dos merozoítos de todas as espécies de *Plasmodium* já estudadas e importante como um alvo potencial para proteção imune (Pizarro *et al.*, 2003). Esta glicoproteína foi completamente sequenciada em várias espécies de *Plasmodium* e sua massa molecular varia de 180 kDa a 230 kDa (Holder & Blackman, 1994). Recentemente foram identificados os genes codificadores de MSP-1 em *P. malariae* e *P. ovale* (Birkemeyer *et al.*, 2010).

Embora a função biológica da MSP-1 ainda não tenha sido definitivamente esclarecida, acredita-se que ela participe do processo de invasão dos eritrócitos, uma vez que seu domínio C-terminal de 19 kDa fornece um sítio no qual o fragmento resultante do processamento primário, MSP-1₄₂, e/ou o do processamento secundário, MSP-1₁₉, associam-se à proteína MSP-9, formando um complexo que se liga a regiões da banda 3 da proteína da membrana de

eritrócito, um receptor importante na invasão de *P. falciparum* (Goel *et al.*, 2003; Kariuki *et al.*, 2005). A proteína MSP1₁₉ tem sido sugerida como altamente imunogênica em condições naturais de exposição humana (Soares *et al.*, 1997; RICCIO *Et al.*, 2013; Uplekar *et al.*, 2017; Kale *et al.*, 2019)

A proteína de ligação ao antígeno Duffy (*Duffy Binding Protein* - DBP), está presente no micronema do parasito e é utilizada para invadir os reticulócitos, através da interação com o seu receptor nos eritrócitos, o antígeno de grupo sanguíneo Duffy/receptor de quimiocinas (DARC) (Miller *et al.*, 1976; Wertheimer & Barneweel, 1989). Uma vez estabelecida a ligação entre PvDBP e o DARC o processo de invasão se torna irreversível (Wertheimer & Barnwell, 1989). Esta proteína pertence à família de proteínas homólogas que se ligam aos eritrócitos conhecida como DBL-EBP (*Duffy binding like-erythrocyte binding protein*) (de Sousa *et al.*, 2014). O ligante funcional da PvDBP encontra-se na região II (DBPII), que corresponde ao domínio DBL (*Duffy binding like*) (Adams *et al.*, 1992). Este domínio compreende 330 aminoácidos contendo 12 resíduos de cisteína, onde foi mapeado o sítio de ligação da proteína ao seu receptor nos eritrócitos do hospedeiro. Este domínio está localizado em um segmento de aproximadamente 170 aminoácidos entre as cisteínas 4 e 7, dentro da região II, constitui a região mais polimórfica da proteína (Adams *et al.*, 1992; Ranjan e Chitnis, 1999; Vanbuskirk, *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2006; 2010; Sampath *et al.*, 2013). A PvDBP é considerada o principal antígeno candidato a compor uma vacina contra o *P. vivax*, sendo de fato, o único antígeno de forma sanguínea em fase de triagem clínica (de Cassan *et al.*, 2015; Tham *et al.*, 2016). O objetivo de uma vacina utilizando a DBPII é induzir anticorpos que sejam capazes de impedir a interação entre merozoítos de *P. vivax* e o receptor DARC presente na superfície dos reticulócitos, e, conseqüentemente, bloquear a invasão (Than *et al.*, 2016).

Diante disso, acreditava-se que indivíduos que não apresentavam o receptor na superfície de seus reticulócitos (DARC negativo), eram altamente resistentes à infecção pelo *P. vivax* (Miller *et al.*, 1976). No entanto, estudos recentes têm demonstrado indivíduos DARC negativos, infectados pelo *P. vivax*. O que sugere que este parasito possa utilizar uma via alternativa para invasão dos eritrócitos (Ryan *et al.*, 2006; Cavasini *et al.*, 2007; Menard *et al.*, 2010; Lo *et al.*, 2015).

A PvDBP é altamente polimórfica, estudos anteriores identificaram que os principais resíduos polimórficos ocorrem no domínio de ligação, presente na região II da proteína. Estudos sobre a variabilidade genética da PvDBP foram realizados ao longo do mundo, demonstrando que o padrão de variabilidade na região II difere entre os isolados do parasito provenientes das diferentes áreas geográficas estudadas (Xainli *et al.*, 2003; Cole-Tobian & King, 2003; Herrera

et al., 2005; Sousa *et al.*, 2006; 2010; 2011; Ceravolo *et al.*, 2009; Babaeekhou, Zakeri, Djadid, 2009; Kano *et al.*, 2012).

A proteína de ligação aos eritrócitos 2 (*Erythrocyte Binding Protein 2* -, EBP2), foi descrita por Hester e colaboradores (2013) através da reanotação do genoma do *P. vivax*. Esses autores demonstraram que esta proteína é expressa durante o estágio sanguíneo do ciclo parasitário, o que sugere um possível papel desta durante o processo de invasão dos reticulócitos (Hester *et al.*, 2013). Esta proteína possui uma afinidade por reticulócitos com alta expressão de CD71 (CD71^{high}), correspondente a reticulócitos muito jovens, presentes principalmente na medula óssea (Ntumngia *et al.*, 2016).

Apesar da falta de evidência direta, suas características conservadas e dados epidemiológicos sugerem que PvEBP2 pode desempenhar um papel na invasão de reticulócitos independente de DARC (Ntumngia *et al.*, 2016; Roesch *et al.*, 2018). A evidência de seleção diversificadora positiva dentro do domínio do ligante PvEBP2 semelhante ao de DBPII é uma indicação de uma função biológica importante, incluindo invasão de reticulócitos e / ou um alvo de imunidade adquirida (Roesch *et al.*, 2018). Além disso, o papel de PvEBP2 como um ligante de proteína é suportado por análises sorológicas recentes (Franca *et al.*, 2016; 2017; He *et al.*, 2019). PvEBP2 é um alvo da imunidade naturalmente adquirida após exposição natural ao *P. vivax* e é sugerido ser um possível marcador sorológico para detectar infecções recentes por *P. vivax* (Longley *et al.*, 2020).

1.4 Resposta imune naturalmente adquirida contra malária

A resposta imune na malária é complexa e ocorre contra combinações antigênicas distintas, formadas por antígenos polimórficos e variações antigênicas que cada estágio de vida do parasito pode apresentar (Struik & Rilet, 2004). O hospedeiro utiliza diferentes mecanismos efetores que envolvem a imunidade inata e adaptativa. Porém, os mecanismos imunológicos que participam da proteção clínica não estão bem definidos, apesar de diferentes modelos animais contribuírem, significativamente, para a compreensão de vários aspectos da resposta imune na malária (Good & Doolan, 1999).

A imunidade naturalmente adquirida pode ser definida como a capacidade do hospedeiro responder de forma efetiva e rápida durante uma segunda e subseqüentes exposições a um patógeno quando comparado a exposição primária ao mesmo agente (Koch, 1900). Essa imunidade contra o agente causador da malária é atingida após sucessivas exposições e

infecções ao longo do tempo, fenômeno muito observado em áreas de alta incidência da doença (Koch, 1900; Langhorne *et al.*, 2008).

Em áreas de transmissão intensa da malária indivíduos primoinfectados quase sempre adoecem na primeira exposição, desenvolvendo uma doença febril que pode se agravar e, inclusive, ocasionar a morte. Entretanto, após exposição contínua e ininterrupta, esses indivíduos sofrem progressivamente, menos episódios de malária, refletindo a aquisição de uma imunidade clínica protetora (Cohen *et al.*, 1961; Mc Gregor, 1974; Baird *et al.*, 1991). Essa diferença na sintomatologia da doença é atribuída principalmente ao estabelecimento da imunidade naturalmente adquirida sendo os anticorpos os principais componentes desse mecanismo (Cohen, Mcgregot; Carrington, 1961).

No entanto, vale destacar que vários fatores influenciam na aquisição, amplitude e magnitude dessa imunidade como, fatores genéticos e idade do hospedeiro; espécie e variabilidade do parasito; exposição prévia à malária, bem como o nível de transmissão sob o qual os indivíduos estão ou foram expostos (Fowkes; Boeuf; Beeson, 2016; Mueller *et al.*, 2013a; Nogaro *et al.*, 2011). Anticorpos desempenham um importante papel na imunidade adquirida na malária, esse papel vem sendo estudado desde a década de 1960, no qual se observou uma redução na parasitemia e sintomas clínicos em crianças e indivíduos infectados que receberam imunoglobulinas passivamente ou purificada de indivíduos imunes, respectivamente (Cohen, Mcgregot; Carrington, 1961; Mcgregor *et al.*, 1963; Sabchareon *et al.*, 1991). Este fato pode ser explicado porque esses anticorpos podem atuar por meio de diferentes mecanismos, incluindo morte direta do parasito, facilitação da fagocitose de hemácias infectadas opsonizadas, citotoxicidade celular dependente de anticorpos e bloqueio da invasão de hepatócitos ou reticulócitos (Langhorne *et al.*, 2008, Muller *et al.*, 2015; Tham *et al.*, 2017; Draper *et al.*, 2018). A literatura que aborda a resposta de anticorpos contra antígenos de *P. vivax* é vasta e complexa, tendo várias revisões e meta-análises já publicadas (Silveira *et al.*, 2018; Folegatti *et al.*, 2017; Cutts *et al.*, 2014; Barry *et al.*, 2014; Jong *et al.*, 2019; De *et al.*, 2021).

Os anticorpos contra o plasmódio são direcionados contra antígenos altamente polimórficos (Chan *et al.*, 2012). A extensa diversidade genética do parasito pode funcionar como uma forma de escape do sistema imune do hospedeiro (Scherf, Lopez-Rubio, Riviere, 2008; Takala, Plowe, 2009), dificultando o desenvolvimento de uma resposta imune eficiente. Estudos sugerem que indivíduos expostos a infecções por múltiplos clones do parasito tendem a desenvolver proteção clínica com um repertório de anticorpos capaz de combater diferentes variantes do parasito (King *et al.*, 2015; Murungi *et al.*, 2013).

As imunoglobulinas G (IgG) são um importante componente da imunidade contra a malária, com função definida pelo reconhecimento específico de antígenos (Wardemann *et al.*, 2018). As subclasses de IgG, IgG1-IgG4 têm diferenças na região Fc que afetam sua afinidade para variantes dos receptores Fc γ , influenciando sua função efetora, longevidade e capacidade de cruzar a barreira transplacentária (Vidarsson *et al.*, 2014; Valenzuela *et al.*, 2018). A troca de subclasse de IgG e a maturação de afinidade (Gatto *et al.*, 2010; De Franco *et al.*, 2016) são componentes importantes que ditam a imunidade na malária (Cohen *et al.*, 1961; Cohen *et al.*, 1970; Tutterrow *et al.*, 2012). As respostas dos anticorpos contra a malária são predominantemente citofílicas (IgG1 e IgG3) e mostraram mediar os mecanismos efetores que inibem o crescimento do parasita (White *et al.*, 2014; Biryukov *et al.*, 2016), promovem a fagocitose por opsonização (OSIER *et al.*, 2014) e a fixação do complemento (Behet *et al.*, 2018; Boyle *et al.*, 2015).

De modo geral, os trabalhos que avaliam a dinâmica de anticorpos na malária têm como principal foco a IgG, uma vez que é a imunoglobulina sérica mais abundante e apresenta maior persistência diante de uma resposta secundária, estando intrinsecamente ligada à memória imunológica (Coico, Sunshine, 2009). No entanto, a evidência de uma associação entre os níveis de anticorpos e proteção é muito mais limitada, já que a sorologia convencional normalmente falha em distinguir anticorpos protetores (bloqueadores) de não protetores. A determinação da presença de anticorpos bloqueadores requer a realização de um ensaio funcional de ligação com eritrócitos *in vitro*, utilizando células COX-7 transfectadas com a proteína DBP, por exemplo (Michon *et al.*, 2000). A presença desses anticorpos já foi demonstrada pelo nosso grupo em áreas de transmissão instável em diferentes populações da Amazônia Brasileira (Ceravolo *et al.*, 2008).

Durante a fase pré-eritrocítica, a resposta adquirida ocorre contra os esporozoítos e esquizontes hepáticos. Durante o rápido período de tempo que os esporozoítos permanecem no sangue, os mesmos são capazes de estimular a produção de anticorpos que se ligam a CSP, impedindo a invasão dos parasitos no hepatócito (Herrera & Herrera, 2001; Good *et al.*, 2005). Vários trabalhos utilizaram técnicas moleculares e sorológicas tendo alvo como o CSP para avaliar a prevalência de infecção por diferentes espécies de *Plasmodium* sp. (incluindo as variantes de *P. vivax*) em áreas endêmicas e não endêmicas para a malária (WIRTZ *Et al.*, 1990, Kain *et al.*, 1991; 1992, Qari *et al.*, 1992; 1993; Bonilla *et al.*, 2006; Machado & Póvoa, 2000; Storti-Melo *et al.*, 2009; Arruda *et al.*, 2007; Curado *et al.*, 1995; Pereira *et al.*, 2018).

A prevalência de anticorpos contra antígenos da CSP de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* tem sido avaliada em diferentes populações, utilizando peptídeos recombinantes

contendo as sequências da região não repetitiva assim como parte das variantes da região repetitiva central (Franke *et al.*, 1992; Kreamsner *et al.*, 1992). A utilização de peptídeos sintéticos lineares permitiu a identificação de vários epítomos de células B e T ao longo da proteína. Numerosos estudos conduzidos em uma variedade de configurações epidemiológicas revelaram que os níveis e a soroprevalência de anticorpos anti-esporozoítos, especialmente aqueles contra o epítomo repetitivo da CSP de *P. falciparum*, são um preditor de exposição ao parasita ao longo do tempo e são um bom indicador da intensidade de transmissão da malária (Bwire *et al.*, 1998; Nothdurft *et al.*, 1999; Kusi *et al.*, 2014; 2016). Além de demonstrar que uma resposta imune humoral anti-esporozoíta é independente de uma infecção no sangue, mas se correlaciona com a exposição e aumenta com a idade (Del Giudice *et al.*, 1990; Esposito *et al.*, 1986; Tapchaisri *et al.*, 1985).

Um estudo de acompanhamento longitudinal dos indivíduos relatou que, embora em títulos baixos, as respostas de IgG às duas variantes principais de CSP tiveram vida longa, mesmo na ausência de reinfeção (Longley *et al.*, 2016). Este estudo também mostra que os indivíduos que foram reinfetados tinham níveis mais elevados de anticorpos anti-CSP que diminuiriam logo após o tratamento. Após um surto de malária por *P. vivax* no Brasil, as respostas de IgG contra PvCSP recombinante permaneceram em cerca de 50% da população oito meses após o tratamento em pacientes que não foram expostos ao Plasmodio anteriormente (BRAGA *et al.*, 1998). Altas frequências de anticorpos IgM contra peptídeo PfCSP (aproximadamente 67%) foram detectado em indivíduos de uma zona rural perto de Porto Velho, região endêmica (Pratt-Riccio *et al.*, 2017).

Na fase eritrocítica também ocorre a presença de anticorpos direcionados aos antígenos dessa fase do parasito e podem bloquear a invasão dos merozoítos nas hemácias interrompendo seu desenvolvimento (Cohen; Butcher; Cradall, 1969; O'donnell *et al.*, 2001), atuar em conjunto com o sistema complemento para lise do parasito (Boyle *et al.*, 2015), bem como favorecer a fagocitose do merozoíto (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. Porém, pouco se sabe sobre a via de aquisição e manutenção de anticorpos funcionais e protetores na malária.

Os anticorpos naturalmente adquiridos contra PvAMA-1 bloqueiam a ligação ao receptor, semelhante ao que ocorre com a resposta anti-DBPII. A análise das respostas de anticorpos neutralizantes para PvAMA1 identificou o epítomo 1F9 como um alvo antigênico atraente, ele é polimórfico e pode estar associado com proteção imune cepa-específica (Coley *et al.*, 2007). Durante infecções naturais por *P. vivax*, PvAMA-1 é altamente imunogênico

(Rodrigues *et al.*, 2005; Motevalli *et al.*, 2012; Pires *et al.*, 2018) e servindo como um biomarcador sensível para detectar flutuações em áreas de transmissão instável da malária (Pires *et al.*, 2018).

Estudos semelhantes em roedores e PNH mostram que PvAMA1 é um alvo para respostas imunes protetoras (Kocken *et al.*, 1999; Narum *et al.*, 2000). Uma vacina recombinante baseada no domínio II de PvAMA-1 em diferentes formulações de adjuvantes desencadeou títulos de anticorpos anti-AMA-1 significativos em camundongos. Mais importante ainda, esses anticorpos induzidos pela vacina são inibitórios, impedindo a invasão de reticulócitos por diferentes isolados asiáticos de *P. vivax* (Gentil *et al.*, 2010; Vicentin *et al.*, 2014).

Sabe-se que o PvDBP é altamente polimórfica e diferentes estudos sugerem que os polimorfismos comumente observados na PvDBPII podem alterar o seu caráter antigênico e interferir no bloqueio da ligação PvDBPII-DARC por anticorpos inibitórios (Xainli *et al.*, 2003; Vanbuskirk *et al.*, 2004a). Vanbuskirk e colaboradores (2004a) demonstraram que alguns resíduos polimórficos dentro do domínio de ligação da PvDBP (região II) foram capazes de alterar significativamente a antigenicidade da proteína em um ensaio de ligação de eritrócitos *in vitro*. O padrão de polimorfismos excessivos e a alta taxa de polimorfismos não sinônimos no domínio do ligante sugerem que esta variação alélica funciona como um mecanismo de evasão imune (Sousa *et al.*, 2006).

A resposta imune humoral contra a DBPII foi avaliada em diversas populações de diferentes regiões geográficas e perfis de transmissão da malária, inclusive no Brasil (Ceravolo *et al.*, 2005; 2009; Kano *et al.*, 2012; 2016; Fowkes; Boeuf; Beeson, 2016). A DBPII se mostrou naturalmente imunogênica com frequência de respondedores variando entre as populações estudadas de diferentes regiões (de 40% a 80%). A resposta anti-DBP foi associada ao tempo de exposição ao parasito, aumento da idade e o número de episódios prévios de malária, uma vez que com o passar do tempo o indivíduo de área endêmica se expõe repetidas vezes à proteína do parasito (Cole-Tobian *et al.*, 2002; Kano *et al.*, 2012; King *et al.*, 2008; Souza-Silva *et al.*, 2010). Além disso, os anticorpos produzidos contra a DBPII mostraram capacidade de inibir a interação entre essa proteína e seu receptor (DBPII-DARC), reduzindo a interação e invasão dos reticulócitos pelos merozoítos (Ceravolo *et al.*, 2008, 2009; Chootong *et al.*, 2010; 2012; Grimberg *et al.*, 2007; King *et al.*, 2008; Nicolete *et al.*, 2016; Souza-Silva *et al.*, 2014). Essa resposta de anticorpos inibitórios também foi associada à proteção clínica contra a doença (King *et al.*, 2008; Nicolete *et al.*, 2016).

Apesar do seu importante papel na invasão, poucos indivíduos desenvolvem uma resposta de anticorpos contra a DBPII, inclusive residentes de áreas de alta endemicidade para a malária,

como os países do Sudeste Asiático (Cole-Tobian *et al.*, 2009b). Alguns fatores podem explicar a baixa imunogenicidade da DBPII como: a exposição da proteína ao sistema imune do hospedeiro somente no momento da invasão dos reticulócitos (Adams *et al.*, 1990); região altamente polimórfica (Tsuboi *et al.*, 1994); resposta de anticorpos variante-específica (Ceravolo *et al.*, 2009).

Nosso grupo de pesquisa foi um dos primeiros a mostrar que a resposta de anticorpos inibitórios (BIAbs, do inglês *Binding Inhibitory Antibodies*) da interação DBPII-DARC é variante específica. Neste estudo foi demonstrado que indivíduos expostos a um surto ocorrido em Minas Gerais - região não endêmica para malária – desenvolveram anticorpos contra a DBPII com capacidade de bloquear apenas a interação DBP-DARC da variante identificada no surto (Ceravolo *et al.*, 2009). Outros estudos também evidenciaram que a resposta de BIAbs contra DBPII é variante-específica, sendo essa resposta associada com a proteção homóloga contra malária clínica (Chootong *et al.*, 2012; Cole-Tobian *et al.*, 2009a). Nesse sentido, devido à grande variabilidade entre os isolados de DBPII circulantes em diferentes regiões geográficas, a análise de sequências disponíveis, sugere que pelo menos sete variantes deveriam ser incluídas na vacina contra *P. vivax* para atingir uma cobertura de 60% (Nóbrega De Sousa; Carvalho; Alves De Brito, 2011). Esses trabalhos evidenciam que o desenvolvimento da resposta imune adquirida para DBP é complexa. Dessa forma, a utilização da DBPII em uma vacina contra o *P. vivax* deve levar em consideração estratégias que auxiliem no desenvolvimento de uma resposta de anticorpos com capacidade de desenvolver anticorpos de ampla reatividade às variantes.

O potencial do PvMSP-1 como candidato a vacina é baseado em estudos que relataram que é altamente imunogênico em condições naturais de exposição (Soares *et al.*, 1997; Soares *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2003; Morais *et al.*, 2005; Barbedo *et al.*, 2007). Esses estudos relacionados à resposta imune naturalmente adquirida contra a proteína MSP-1 de *P. vivax* (PvMSP-1) foram desenvolvidos após a elucidação da estrutura primária do gene que codifica esse antígeno (Del Portillo *et al.*, 1991). Vários estudos forneceram evidências de que o MSP1₁₉ é um alvo para a imunidade protetora contra estágios sanguíneos assexuados de parasitas da malária (Ling *et al.*, 1994; Daly *et al.*, 1995; Holder *et al.*, 1999; Malkin *et al.*, 2007). Desde então, o potencial imunogênico da MSP-1 tem sido avaliado em diferentes modelos experimentais, incluindo roedores (Ling *et al.*, 1994) e primatas não-humanos (Hui *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1999). Essa imunidade protetora demonstrou estar correlacionada com os níveis de anticorpos anti-MSP1₁₉ e também é dependente de células T CD4 (Daly *et al.*, 1995; Hirunpetcharat *et al.*, 1997 e 1998; Riccio *et al.*, 2013).

Em relação à resposta imune contra a EBP-2, foi demonstrado que níveis de anticorpos anti-PvEBP2 mostram estar positivamente correlacionados com a idade, exposição cumulativa e estão associados à proteção e risco reduzido de doença clínica (França *et al.*, 2016; 2017; He *et al.*, 2019). Nosso grupo demonstrou que a resposta de anticorpos anti-EBP2 aumenta em função de uma maior exposição à malária (idade e tempo de residência na área endêmica), em uma população de assentamento agrícola da Amazônia (Rio Pardo, AM) (Torres, 2017). Além de ter demonstrado pela primeira vez, que essa proteína é altamente imunogênica (soropositividade de 70% da população), quando comparada à proteína DBPII (36% de respondedores) (Torres, 2017).

Embora esteja bem estabelecido que as respostas de anticorpos IgG naturalmente adquirida estão associadas à imunidade clínica protetora contra malária em estágio sanguíneo (Cohen *et al.*, 1961; Sabchareon *et al.*, 1991), o papel da imunoglobulina M (IgM) não está bem definido e pode ter um papel subestimado na malária (STONE, LUED, 2016, PLEASS *et al.*, 2016). Um estudo recente em modelo murino de malária demonstrou que as células B de memória produziam IgM específicos contra *Plasmodium* com alta afinidade e dominavam a resposta de memória precoce em infecções recorrentes de malária (Krishnamurthy *et al.*, 2016). Da mesma forma, a produção de anticorpos IgM protetores durante a malária experimental fornecem evidências de mecanismos adicionais pelos quais o sistema imunológico controla a infecção por *Plasmodium* (Couper *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2018). Esses resultados podem explicar os dados recentes que associam a amplitude dos anticorpos IgM específicos de *Plasmodium falciparum* com a resistência genética à infecção por malária demonstrada no grupo étnico Fulani no oeste da África (Arama *et al.*, 2015) e com o risco reduzido de aparecimento de malária clínicas em uma coorte de crianças (BOYLE *et al.*, 2019). Em conjunto, estes estudos sugerem que os anticorpos IgM parecem ser muito mais do que apenas uma resposta precoce à infecção recente por malária (Boonyaratanakornkit J & Taylor, 2019).

No que diz respeito a persistência de anticorpos, Patgaonkar e colaboradores (2018) mostraram que os níveis de IgM foram estáveis durante 30 dias (infecção aguda e após recuperação) em indivíduos com infecção pelo *P. vivax* no Oeste da Índia. Nosso grupo de pesquisa acompanhou uma população nativa da região Amazônica durante 9 anos e demonstrou que a resposta de IgM anti-DBPII de *P. vivax* foi estável durante todo este período (Medeiros *et al.*, 2020), evidenciando uma possível contribuição da IgM na resposta de longa duração a malária.

1.5 Malária extra-Amazônica e de Mata Atlântica

Além do grande número de casos de malária na Amazônia legal, casos da doença têm sido descritos fora da área considerada endêmica, na região conhecida como extra-amazônica, incluindo regiões de Mata Atlântica. A região extra-Amazônica é composta pelos estados do Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Sergipe, Santa Catarina, São Paulo e o Distrito Federal, onde habitam aproximadamente 86% da população brasileira (SVS/MS, 2022).

Em um estudo descritivo feito por Braz e colaboradores foram observados que entre os anos de 2012 a 2017 foram notificados 3.797 casos de malária na região extra-Amazônica segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (Braz *et al.*, 2020). Sendo o MS, no período de 2010 a 2021 foram notificados 8.317 casos positivos de malária na região extra-amazônica, com 50,0% (4.163) dos casos notificados na Região Sudeste. Os estados com maior número de casos foram São Paulo (1.847 casos), Rio de Janeiro (878 casos) e Minas Gerais (796 casos) (SVS/MS, 2022 b).

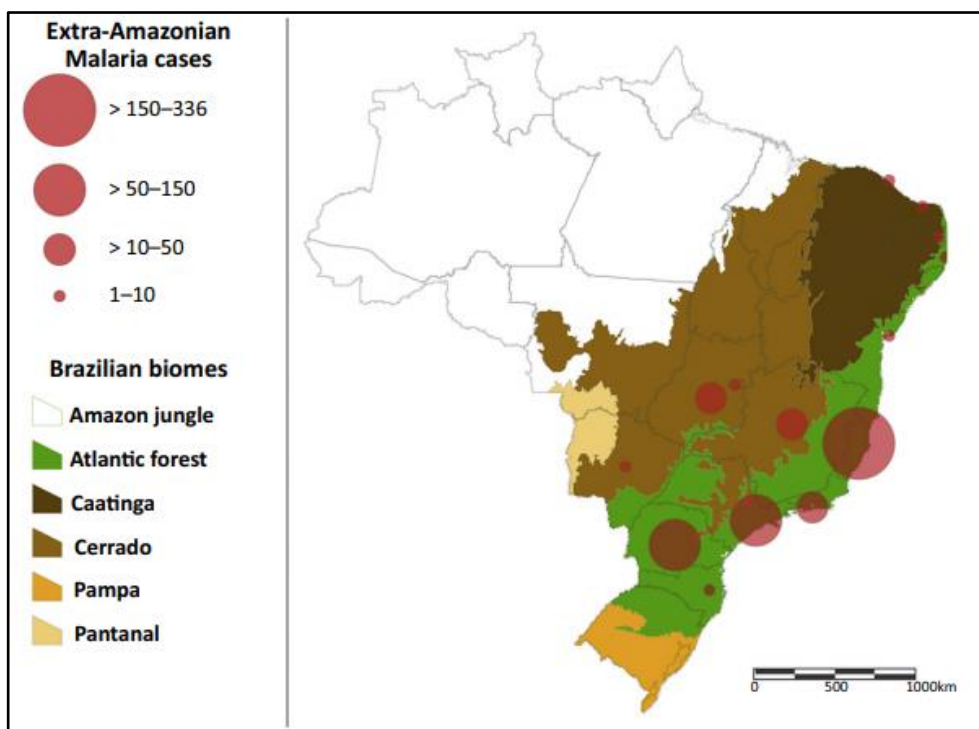
Em 2021, foram registrados 99 casos autóctones na região extra-amazônica, esses casos ocorreram na Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Paraná, Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo (SVS/MS, 2022 b). Nos anos anteriores, a maioria dos casos notificados nessa região eram importados. Atualmente, os casos autóctones de malária nessa região representam um terço (1/3) do total de casos notificados, demonstrando que a doença pode voltar a ser endêmica nessa área, principalmente devido à ocorrência de surtos e a presença do vetor (SVS/MS, 2020).

Embora a região extra-Amazônica tenha participação pequena nos números de casos, a doença não pode ser negligenciada. Esse problema reside em uma maior risco de formas graves da doença por dois motivos principais: alta susceptibilidade dos indivíduos à infecção por *Plasmodium*, devido à ausência de resposta imune protetora, haja visto que essa se desenvolve ao longo do tempo mediante repetidas exposições ao parasito (Langhorne *et al.*, 2008; Braz *et al.*, 2013) e falta de suspeita clínica-epidemiológica nos serviços de saúde, atrasando o diagnóstico e a implementação do tratamento correto (Oliveira *et al.*, 2012; Brasil *et al.*, 2013; Chaves *et al.*, 2013; Dotrário *et al.*, 2016; Braz *et al.*, 2020).

Um número pequeno, mas consistente, de casos autóctones tem sido relatado nas regiões sul e sudeste do Brasil, onde a malária humana deixou de ser considerada endêmica há 50 anos (Siqueira *et al.*, 2016). A maioria desses casos ocorre em áreas cobertas pelo bioma Mata

Atlântica (de Pina-Costa *et al.*, 2014) (Figura 6). A Mata Atlântica é considerada uma reserva mundial da biosfera. Apresentando complexas condições (altitude, longitude, alta temperatura, alta umidade e distribuição de chuvas) que favorecem a existência de uma grande diversidade biológica e endemismo de muitas espécies de animais e plantas, por exemplo Bromélias (Ribeiro *et al.*, 2009). Esta floresta ocupa regiões tropicais e subtropicais em 17 estados, abrangendo cerca de 15% do território nacional (ou seja, todos os estados extra-amazônicos, exceto Mato Grosso e Distrito Federal) (Ribeiro *et al.*, 2009; de Pina-Costa *et al.*, 2014; Fundação Sos Mata Atlântica).

Figura 6- Mapa do Brasil com biomas e número de casos de malária na região extra-amazônica de 2007 a 2017



Legenda: Os dados de casos confirmados de malária foram coletados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/DATASUS; <http://portalsinan.saude.gov.br/malaria>). Todos os casos foram causados por espécies de *Plasmodium* sp. relatadas na região Extra-amazônica. Os **círculos vermelhos** e seus tamanhos indicam relação positiva com o número de casos de malária detectados em cada região. Os biomas estão destacados de diferentes cores: **Selva Amazônica**, a maior floresta tropical úmida do planeta - Branco; **Mata Atlântica**, estende-se ao longo da costa atlântica do Brasil e é caracterizada por alta biodiversidade e endemismo - Verde bandeira; A **Caatinga**, com solos e vegetação secos, sofre risco de desertificação - Maron; **Cerrado**, savana com maior biodiversidade do mundo - Maron claro; **Pampa**, composto principalmente por planícies - Amarelo caramelo ; e **Pantanal**, o maior ambiente tropical úmido do mundo - Bege claro. **FONTE:** Multini *et al.*, 2019.

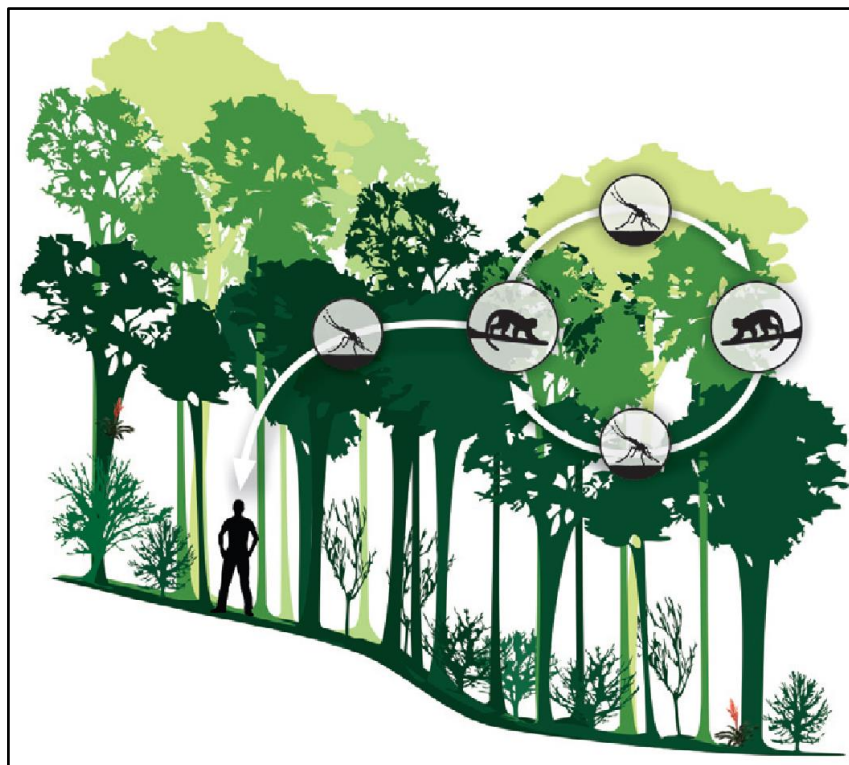
Treze por cento da Mata Atlântica encontra-se dentro dos três maiores fragmentos localizados na Serra do Mar, onde ocorre a maioria dos casos de malária. Um fica entre São Paulo e Rio de Janeiro, outro está na zona costeira de Santa Catarina e o terceiro está localizado na zona costeira do Paraná (Silva *et al.*, 2007; de Pina-Costa *et al.*, 2014).

Acredita-se que as características da Mata Atlântica criam condições ecológicas adequadas para a reprodução de algumas espécies de mosquitos vetores da malária. As florestas com cobertura de bromélias fornecem um habitat favorável para vetores do grupo *Kerteszia* (Deane 1992; Guimarães *et al.*, 2003; Domingos *et al.*, 2006; de Pina-Costa *et al.*, 2014). As espécies vetores responsáveis pela transmissão da malária nessa região são principalmente, *Anopheles (Kerteszia) cruzii* e *Anopheles (Kerteszia) Bellator* (Deane, 1969; Deane *et al.*, 1969 a, b; Forattini *et al.*, 1986).

A doença nessa região ficou conhecida como “Malária de bromélia” (Pittendrigh, 1948), uma vez que os mosquitos vetores, utilizam as coleções de água que se formam nos vértices das bromélias para realizar a sua oviposição e desenvolvimento de suas fases larvais (Deane *et al.*, 1992; de Pina-Costa *et al.*, 2014). O conhecimento do papel das bromélias no ciclo de vida do vetor da malária foi utilizado como estratégia de erradicação da doença em algumas regiões do país, técnica conhecida como desbromelização e aplicação de larvicida e inseticida nas matas (Deane *et al.*, 1988).

Por anos se levantou a hipótese de que a transmissão da malária na Mata Atlântica poderia ser zoonótica, em decorrência da existência da infecção por *Plasmodium* em primatas neotropicais e dos frequentes casos autóctones na região (Deane *et al.*, 1996). O professor Leônidas Deane e colaboradores propuseram que os macacos poderiam servir como reservatórios de *Plasmodium*, que poderia ser transmitido às pessoas por *Anopheles* sp., pois apresentam uma característica muito peculiar (acrodendrofílica), com sua dispersão vetorial vertical, permitindo a realização do repasto sanguíneo tanto ao nível do solo (permitindo o contato com o homem), quanto ao nível da copa das árvores (permitindo o contato com primatas neotropicais) (Deane *et al.*, 1996; Deane *et al.*, 1992). Diante dessas informações, foi levantada a hipótese que a malária na região de Mata Atlântica seria uma zoonose (Deane *et al.*, 1992) (FIGURA 7). Em 2017 foi comprovada molecularmente um surto de *P. simium* em humanos na Mata Atlântica do Rio de Janeiro (Brasil *et al.*, 2017).

Figura 7 - Esquema hipotético de transmissão da malária como zoonose em regiões de Mata Atlântica



Legenda: Esquema demonstra que em algumas condições, *Anopheles (Kerteszia) cruzii* pode picar tanto na copa das árvores quanto próximo ao solo, o que pode favorecer a transmissão de plasmódios símios para humanos na natureza ou nas proximidades da floresta. **Fonte:** de Pina-Costa *et al.*, 2014.

Casos autóctones foram registrados no Rio de Janeiro (Miguel, 2011), São Paulo (Andrade *et al.*, 1986; Branquinho *et al.*, 1997; Carréri-Bruno *et al.*, 1995; Curado *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2008), Espírito Santo (Cerutti *et al.*, 2007) e no sul do país, em Santa Catarina. Nestes casos os pacientes apresentam uma sintomatologia branda com parasitemia baixa e em alguns casos podem ser assintomáticos (Carvalho *et al.*, 1985; Barata, 1995; Branquinho *et al.*, 1997; Cerutti *et al.*, 2007; Couto *et al.*, 2010; de Pina-Costa *et al.*, 2014). A maioria desses casos são diagnosticados como *P. vivax*, uma vez que a morfologia dos parasitos é muito semelhante, e a microscopia é a técnica padrão-ouro para o diagnóstico de malária (Deane, 1992). Entretanto essa técnica apresenta uma série de limitações, uma delas é a dificuldade de diferenciar certos plasmódios de primatas não-humanos dos parasitos que infectam humanos, uma vez que apresentam similaridade morfológica, outra limitação é sua baixa sensibilidade, não sendo capaz de identificar parasitemias baixas.

A Mata Atlântica é um dos biomas mais ameaçados do mundo, e a maior parte da floresta foi reduzida a pequenos fragmentos cercados por áreas urbanizadas. Como consequência dessa fragmentação, humanos, PN e vetores provavelmente compartilham os mesmos ambientes e, portanto, têm maior contato (Multini *et al.*, 2019). Assim, devido à

presença de vetores da malária em todo território nacional, há risco de reintrodução intensificado pelo fluxo de migração para áreas suscetíveis (de Pina-Costa *et al.*, 2014; Lorenz *et al.*, 2015; Braz *et al.*, 2016; Braz, 2020). No contexto da erradicação da malária, esses casos na região extra-Amazônica em especial de Mata atlântica, merecem uma maior atenção da comunidade científica, profissionais de saúde, serviço de vigilância epidemiológica e governantes.

1.6 Malária em Primatas Não-humanos

Existem mais de 250 espécies de *Plasmodium* que infectam naturalmente muitos grupos de diferentes vertebrados, aves, répteis e mamíferos, incluindo os primatas (Collins *et al.*, 2003; FAUST, 2015). *Plasmodium* é um protozoário muito adaptado, tendo em vista o seu ciclo complexo, que envolve sua sobrevivência e multiplicação em hospedeiros tão diferentes, o que depende conjuntamente de vários fatores bem ajustados (Coatney *et al.*, 1971; Nishimoto *et al.*, 2008).

Dentre as espécies de PNHs, um grande número é altamente suscetível à infecção malárica no Velho Mundo e no Novo Mundo (Faust *et al.*, 2015; Martinelli & Culleton, 2016). Até o momento, foram descritas 64 espécies de *Plasmodium* infectando PNHs (Liu *et al.*, 2010; Prugnolle *et al.*, 2011; Snounou *et al.*, 2011; Rayner *et al.*, 2011; Pacheco *et al.*, 2011; Pacheco *et al.*, 2013; Boundenga *et al.*, 2015; Herbert *et al.*, 2015; Makanga *et al.*, 2016). Destas, algumas espécies de *Plasmodium* infectam chimpanzés e gorilas na África Central e do Oeste, orangotangos na Indonésia e Malásia, gibões no sudeste asiático, PNHs do Velho Mundo na África e Ásia, lêmures em Madagascar e apenas duas espécies de *Plasmodium* parasitam primatas neotropicais (Leclerc *et al.*, 2004; Gysin, 1998; Deane *et al.*, 1992).

Desde a década de 60 já se tem conhecimento de que o *Plasmodium* de PNHs pode infectar o homem (Chin *et al.*, 1965; Deane, 1966). No contexto da eliminação da malária, os PNH como fonte de infecções por *Plasmodium* em seres humanos são um grande desafio para a eliminação da doença. Estudos recentes no continente asiático têm levantado novas possibilidades sobre a epidemiologia da malária. Infecções humanas causadas por *P. knowlesi*, um parasito que infecta primariamente PNH do velho mundo, reforçam que a proximidade de humanos com regiões de mata possibilita com que doenças que circulam naturalmente entre os animais em caráter silvestre, circulem também entre os humanos (CHIN *et al.*, 1965; SINGH *et al.*, 2004; White, 2008; Galinski & Barnwell, 2009; Cox-Singh *et al.*, 2012; Barber *et al.*, 2017).

Casos humanos de malária por *P. knowlesi* foram relatados na Malásia (Vythilingam *et al.*, 2008; Bronner *et al.*, 2009), Filipinas (Luchavez *et al.*, 2008), Mianmar (Zhu *et al.*, 2006), Tailândia (Jongwutiwes *et al.*, 2011), Singapura (Ng *et al.*, 2008), Vietnã (Van Den Eede *et al.*, 2009), Indonésia, Camboja e Laos (Richards & Mueller, 2017). No homem a malária causada por *P. knowlesi* é altamente virulenta, tendo muitas vezes curso fatal (Cox-Singh & Singh, 2008; Coxsingh *et al.*, 2008; Galinski & Barnwell, 2009). Já em seus hospedeiros naturais, *Macaca nemestrina*, *Macaca fascicularis*, *Presbytis melalophos* e *Trachypithecus obscurus*, a infecção é branda e crônica, o que sugere um processo ajustado de coevolução (Galinski & Barnwell, 2009; Moyes *et al.*, 2014). Essas descobertas juntamente com uma importância epidemiológica, levaram ao reconhecimento de *P. knowlesi* como a quinta espécie causadora da malária humana (Singh *et al.*, 2004; Antinori *et al.*, 2013; Yosof *et al.*, 2014). Além disso, também já foram descritos casos de infecção humana naturalmente adquirida por *P. cynomolgi* na Malásia e Camboja (Ta *et al.*, 2014, Imwong *et al.*, 2018). Diante desses casos, a malária zoonótica não pode ser negligenciada, dada suas implicações para eliminação da doença.

Os primatas neotropicais (PN) (Platyrrhini) são um grupo diversificado presente nas Américas, segundo a taxonomia atual existem 171 espécies em cinco famílias (Aotidae, Atelidae, Callitrichidae, Cebidae e Pitheciidae) (Estrada *et al.*, 2017). Essas espécies concentraram-se nos dois principais biomas de floresta tropical: Amazônia e Mata Atlântica. O Brasil é o país com maior diversidade de primatas neotropicais, com 116 espécies de PN (Estrada *et al.*, 2017).

Até o momento foram descritas apenas duas espécies de *Plasmodium* que infectam naturalmente esses animais. *Plasmodium brasilianum* e o *P. simium*. O *P. brasilianum*, foi descrito por Gonder & Von Berenberg-Glosser em 1908, infectando *Cacajao calvus* importado da região Amazônica. Esse parasito está amplamente distribuído da América Central ao sul do Brasil, infectando animais das famílias Atelidae, Aotidae, Callitrichidae, Cebidae e Pitheciidae (Deane *et al.*, 1992; Fandeur *et al.*, 2000, Lalremruata *et al.*, 2015; Alvarenga *et al.*, 2017; Lalremruata *et al.*, 2017). No Brasil, está presente tanto na Amazônia como nas regiões de Mata Atlântica (Cocharane *et al.*, 1985; DEANE, 1992; Loureço-De-Oliveira & Deane, 1995; Duarte *et al.*, 2006; Yamasaki *Et al.*, 2011; Alvarenga *Et al.*, 2017; Nunes *et al.*, 2019; Monteiro *et al.*, 2020).

O *Plasmodium simium*, foi descrito por Fonseca em 1951 infectando um bugio ruivo (*Alouatta guariba clamitans*), na região de Mata Atlântica do estado de São Paulo. Essa espécie de *Plasmodium* apresenta uma distribuição mais restrita, sendo encontrada apenas em áreas de Mata Atlântica de estados do Sul e Sudeste brasileiro. Infectando animais das Famílias Atelidae,

Cebidae e Pitheciidae, dos quais os bugios ruivos (*Alouatta guariba clamitans*) parecem ser os principais reservatórios da malária zoonótica (da Fonseca, 1951; Deane *et al.*, 1969; Deane, 1992; Duarte *et al.*, 2006; Yamasaki *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2014; de Alvarenga *et al.*, 2015; Assis *et al.*, 2015, Nunes *et al.*, 2019; Abreu *et al.*, 2019; Monteiro *et al.*, 2020).

Plasmodium simium e *P. brasilianum* são semelhantes do ponto de vista morfológico, genético e imunológico às espécies humanas, *P. vivax* e *P. malariae*, respectivamente (Deane *et al.*, 1966; Coatney, 1971; Seed, 1976; Arruda *et al.*, 1985; Cochrane *et al.*, 1985; Barnwell, 1986; Deane, 1992; Escalante *et al.*, 1995; Fandeur *et al.*, 2000; Volney *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2005; Tanomsing *et al.*, 2007; Tazi & Ayala, 2011; Guimarães *et al.*, 2012; de Alvarenga *et al.*, 2015; Lalremruata *et al.*, 2015; Brasil *et al.*, 2017).

Ao se falar de malária de PN do Brasil não podemos deixar de destacar o brilhante trabalho do professor Dr. Leônidas Deane, ele foi o primeiro a relatar a infecção acidental natural humana por *P. simium* (Deane *et al.*, 1966). No qual um guarda do Horto Florestal da Cantareira em São Paulo, ao realizar atividades entomológicas para o estudo da malária em PN, apresentou três quadros de paroxismos maláricos (com intervalos de 48 horas), com tremores, febre e dores no corpo, evoluindo em seguida para uma cura espontânea. O professor Deane publicou uma revisão em 1992, no qual foram avaliados 4.585 primatas neotropicais coletados na maior parte dos estados brasileiros e destes, 14,3% (655) apresentavam infecção por *Plasmodium* sp., demonstrando uma prevalência de animais infectados de 10% na região Amazônica, 35% no Sudeste e 18% no Sul (Deane, 1992). Sendo este o estudo com maior número de análises de infecção de PN no Brasil. Neste trabalho ele também descreveu os vetores envolvidos, sendo esses do grupo *Kerteszia*, da espécie *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, abundante nas capturas entomológicas e conhecido como vetor para os macacos em São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Deane, 1992).

O segundo caso de infecção humano natural por *P. brasilianum* foi descrito por Arruda e colaboradores (1989) em quatro tribos indígenas da Amazônia (Arara, Parakana, Asurini e Metuktire), nos estados do Pará e Mato Grosso. Apesar da parasitemia identificada pela análise das lâminas dos indivíduos das tribos ter sido muito baixa (<0,02%), anticorpos contra a proteína Circunsporozoíta (CSP) de *P. brasilianum/P. malariae* foram detectados em 56% dos indivíduos estudados (218/390), 65% foram soropositivos para *P. falciparum* e 76% foram soropositivos para *P. vivax*. De um total de 13 macacos domesticados nas tribos e 28 selvagens analisados durante o estudo, quatro animais domesticados apresentaram lâmina positiva para *P. brasilianum* e todos os animais apresentavam anticorpos contra a CSP de *P. brasilianum/P. malariae*. Dos animais de vida livre investigados todos exibiam anticorpos contra esse antígeno.

Além de humanos e PN reservatórios infectados na mesma área, o grupo avaliou a resposta de anticorpos contra a CSP em mosquitos *A. darlingi*, de um total de 755 mosquitos analisados, três deles eram positivos. Estes resultados levaram à conclusão que a malária se comportou como zoonose nas tribos amazônicas do estudo (de ARRUDA *et al.*, 1989). Mais recentemente, Lalremruata e colaboradores, confirmaram molecularmente a transmissão zoonótica de *P. brasilianum*/*P. malariae*, ao observar com base no sequenciamento do gene 18S rRNA e do gene da proteína CS que 12 indivíduos da comunidade Yanomamis na Amazônia Venezuelana, eram portadores de parasitos da malária que era idênticos à espécie *P. brasilianum* isolado de PN (*Alouatta sinuolus*). Além de demonstrar que as sequências de aminoácidos traduzidas do gene da proteína CS mostraram unidades de repetição imunodominantes idênticas entre os parasitos isolados de humanos e macacos (Lalremruata *et al.*, 2015). A hipótese que a malária na região de Mata Atlântica também seria uma zoonose levantada na década de 1960 pelo professor Dr. Leonidas Deane foi comprovada em 2017 por Brasil e colaboradores (Deane, 1992). Neste trabalho foi demonstrado que o surto de malária da Mata Atlântica de 2015 e 2016 ocorrido no estado do Rio de Janeiro foi causado por *P. simium*, através do sequenciamento do DNA mitocondrial de parasitos isolados de PNs e indivíduos, sugerindo sua transmissão zoonótica e reforçando que primatas não-humanos podem atuar como reservatórios para malária (Brasil *et al.*, 2017).

1.7 Primatas não-humanos como modelos para o estudo da malária

No início do século XX foram relatados que os parasitos da malária de primatas não-humanos compartilham semelhanças com os parasitos da malária humana, proveniente de um ancestral comum estando intimamente ligada à evolução destes parasitos (Coatney, 1971). Parasitos de *Plasmodium* mostram uma grande propensão a transferência lateral de PNHs para humanos e vice-versa. A origem do *P. falciparum* foi recentemente determinada, no qual se observou um ancestral comum que tem como hospedeiro macacos africanos como, Gorilas (Prugnolle *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010), Bonobos (Drief *et al.*, 2010) e Chimpanzés (Duval *et al.*, 2011).

Diante dessa proximidade entre parasitos de PNH e parasitos humanos, espécies de *Plasmodium* sp. que infectam naturalmente PNH são usados como modelo de malária humano. *Plasmodium coatneyi* e *Plasmodium fragile*, que infectam naturalmente PNH são usados como modelos de *P. falciparum* em vários modelos de primatas (*M. mulatta*, *M. fascicularis*, *M. nemestrina* ou *Macaca fuscata*). Nesses modelos podem ser estudados sequestro, formação de rosetas e doença grave, incluindo malária cerebral (Aikawa *et al.*, 1992; Fujioka *et al.*, 1994;

Moreira *et al.*, 2013;). *Plasmodium inui* infecta naturalmente uma grande variedade de espécies de macacos e é considerado um modelo de PNH para *P. malariae*, pois apresenta persistência e uma patologia renal semelhante (Collins *et al.*, 2009).

Plasmodium cynomolgi, que infecta naturalmente uma grande variedade de macacos asiáticos, é um modelo para estudar a biologia, imunologia e patologia de *P. vivax*, uma vez que esta espécie apresenta uma proximidade filogenética com o parasito humano (Praba-Egge *et al.*, 2002; Voorberg-Van *et al.*, 2013; Ylostalo *et al.*, 2005; Dembele *et al.*, 2011; Pasini *et al.*, 2017). Nas Américas, *P. simium* que infecta naturalmente macacos de algumas famílias de PNs e humanos na Mata Atlântica brasileira, é semelhante geneticamente ao *P. vivax*, tem sido descrito como um parasito que recentemente passou por uma transferência de hospedeiro (Tazi & Ayala, 2011; Buery *et al.*, 2017; Brasil *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2018; Mourier *et al.*, 2021). Rodrigues e colaboradores (2018), comparando sequências mitocondriais de *P. vivax* e *P. simium*, observaram uma baixa diversidade nas linhagens do parasito de PNH em comparação com as linhagens do parasito humano, apoiando a hipótese da ocorrência de uma transferência lateral de hospedeiros (homem-macaco) no Brasil. Diante disso, essa proximidade genética nos possibilitaria utilizar *P. simium* como modelo, para entender a sua e a evolução do *P. vivax* nas Américas (Mourier *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2021 a e b)

Como citado anteriormente, os PNH vem sendo por décadas usados como modelo de estudo da malária humano. A utilização deste modelo visa um melhor entendimento sobre a biologia do parasito, interação parasito-hospedeiro, fisiopatologia da doença, estudo de recaídas (para o *P. vivax* e *P. ovale*), resposta imune e avaliação/validação para novos candidatos vacinais e drogas (Powers & Jacobs, 1972; Rossan *et al.*, 1975; Bitonti *et al.*, 1988; Nayar *et al.*, 1997; Wengelnik *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2013; Miles *et al.*, 2015; Herrera *et al.*, 2002; Obaldía *et al.*, 2009; Galinski *et al.*, 1992; Krotoski *et al.*, 1982; Joyner *et al.*, 2015). Infecções humanas por *Plasmodium* sp. foram estudadas usando como modelos PNH, seja diretamente infectando PNH com parasitos humanos ou utilizando espécies de *Plasmodium* de PNH que são evolutivamente próximos aos parasitos humanos, em uma variedade de espécies de PNH com graus variados de sucesso (Pasini & Kocken, 2021). Vale ressaltar a necessidade de se esplenectomizar os animais para permitir a replicação de grande parte dos parasitos em PNHs (Young *et al.*, 1975; Martinelli & Culleton, 2016).

Ao longo dos anos infecções experimentais com diferentes espécies de *Plasmodium* foram realizadas em Chimpanzés (*Pan troglodytes*) (Rodhain, 1956; Krotoski *et al.*, 1982), Rhesus (*Macaca mulata*) (Collins, 2012; Joyner *et al.*, 2019), Babuíno-anúbis (*Papio anubis*) (Ozwarra *et al.*, 2003), *Aotus*, *Saimiri* (Collins *et al.*, 1986; James *et al.*, 1985, Kakoma *et al.*, 1992;

Galinski *et al.*, 1992; Douglas *et al.*, 2015; Herrera *et al.*, 2020) e *Callithrix* (Collins *et al.*, 1987; Langhorne & Cohen, 1979). No entanto, é importante considerar que os chimpanzés, bonobos, gorilas e orangotangos são grandes primatas e, como tal, seu uso em pesquisas científicas foi proibido, embora com exceção de cenários extremos que colocam em risco a saúde humana ou para fins de preservação (Eu, 2010; Altevogt *et al.*, 2012; Office, 1998; Zealand, 1999; Australian Government, 2003). Muitas restrições estão relacionadas com o fato de os estudos de PNH exigirem instalações específicas adequadas e justificativa ética mais rigorosa do que outros modelos animais. Eles também exigem um trabalho colaborativo próximo entre primatólogos e malariologistas, e pessoal especialmente treinado (Beignon, Grand, Chapon, 2014).

Macacos rhesus (*Macaca mulata*) são amplamente utilizados no estudo da malária, uma vez que adultos jovens possuem aproximadamente 5 kg ou mais viabilizando estudos longitudinais de infecção por *Plasmodium* que requerem amostragem repetida em um curto espaço de tempo (Joyner *et al.*, 2016). Espécies de macacos do novo mundo vem sendo utilizados como modelo experimental para o estudo de várias espécies de *Plasmodium*, como *P. vivax* e *P. ovale*, uma vez que esses são modelos pequenos e de fácil manejo (Beignon, Grand, Chapon, 2014). No entanto vale ressaltar que esses animais não são hospedeiros naturais desses parasitos. Trabalhos da literatura demonstraram que *Aotus* e *Saimiri* são completamente refratários a infecção por parasitos sanguíneos de *P. ovale* (Coatney *et al.*, 1971; Millet *et al.*, 1994b). O mesmo foi observado para infecções com a cepa Índia VII de *P. vivax* (Sullivan *et al.*, 2001).

Experimentos *ex vivo* usando hemácias de *Saimiri* infectadas com *P. vivax* foram fundamentais para fornecer evidências da existência do vacúolo parasitóforo, inicialmente considerado um artefato dos experimentos *in vitro* (Pouvelle & Gysin, 1997). O desenvolvimento do modelo de *P. vivax* em *Aotus* e *Saimiri* com o objetivo de fornecer combinações parasita-hospedeiro para estudos de quimioterapia, imunologia e biologia, ofereceu uma oportunidade para aprender sobre os fatores que modulam as interações parasita-hospedeiro e a fisiopatologia (Pasini & Kocken *et al.*, 2021).

As características das infecções por *P. vivax* em macacos do Novo Mundo não parecem depender da espécie do hospedeiro (humano, chimpanzé ou outro *Aotus/Saimiri*) doadora de esporozoítos ou estágio sanguíneo do parasito, mas parecem ser moduladas por características intrínsecas da cepa de *P. vivax* e a imunofisiologia do hospedeiro receptor (Pasini & Kocken *et al.*, 2021). Vários foram os achados e descobertas para a área da malária utilizando o PNH como modelo, no entanto pouco se sabe sobre como o parasito e o hospedeiro se comportam durante uma infecção natural. Do ponto de vista imunológico esse conhecimento é mais restrito.

1.8 Resposta imune anti-malárica em Primatas Neotropicias naturalmente expostos ao *Plasmodium* sp.

O número de estudos que avalia a resposta imune em PNH do novo mundo naturalmente expostos a *Plasmodium* sp. é pequeno. Além disso, se limitam apenas na avaliação da resposta imune humoral dos animais através da busca por anticorpos IgG contra um ou dois antígenos de *Plasmodium* sp., além de amostrar animais de apenas uma localidade e com pouca representatividade das famílias de PN. Até o momento a resposta imune em PN foi estudada em animais do Brasil (de Arruda *et al.*, 1989; Duarte *et al.*, 2006; Yamasaki *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2014; Figueiredo *et al.*, 2017; Monteiro *et al.*, 2020), Guiana Francesa (Volney *et al.*, 2002) e Peru (Gonzalo *et al.*, 1997).

No Brasil somente dois trabalhos avaliaram a resposta imune em animais da Amazônia (de Arruda *et al.*, 1989; Figueiredo *et al.*, 2017) e quatro em animais da Mata Atlântica (Duarte *et al.*, 2006; Yamasaki *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2014; Monteiro *et al.*, 2020). Primatas neotropicais de vida livre presentes em áreas com casos humanos de malária autóctone no estado de São Paulo foram examinados quanto à presença de IgG contra a epítomos da proteína CSP e antígenos de fase sanguínea de *P. vivax*, *P. malariae*/*P. brasilianum* e *P. falciparum* por ELISA. Vinte por cento dos animais do gênero *Alouatta* e 57% dos animais do gênero *Cebus* responderam para pelo menos um dos peptídeos de CSP. Cinquenta e oito por cento dos animais do gênero *Alouatta* apresentavam IgG contra MSP1₁₉ de pelo menos uma das espécies de plasmódio avaliadas (Duarte *et al.*, 2006).

Yamasaki e colaboradores (2011) realizaram um levantamento sorológico em bugios ruivos da região metropolitana de São Paulo, onde identificaram resposta contra CSP, encontrando para a proteína VK210 uma reatividade equivalente a 24%; para a VK247, 20%; para “*P. vivax*-like” 6,81%; para *P. brasilianum*/*P. malariae* 22% e 31,9% para *P. falciparum*. Esse grupo também estudou a resposta para MSP1₁₉ de *P. vivax*, encontrando reatividade em 41% dos animais, além da presença de IgG contra antígenos de fase sanguínea de *P. malariae*/*P. brasilianum* (por Imunofluorescência indireta - IFA) em 31,3% dos animais. Um terceiro levantamento sorológico foi realizado em animais de vida livre e cativeiro do estado de São Paulo e de Indaial - Santa Catarina, por Monteiro e colaboradores (2020). Nesse estudo foi avaliada a presença de IgG contra proteínas MSP1 de *P. vivax*, *P. malariae*/*P. brasilianum* e *P. falciparum*. Sessenta e três por cento dos animais de vida livre e 35% dos animais de cativeiro, responderam a pelo menos um dos antígenos testados. O nosso grupo identificou uma alta frequência de PNH respondedores para AMA-1 (83%), DBPII (67%) e para o MSP-1 64%, todos de *P. vivax*, em bugios ruivos de Indaial / Santa Catarina (Costa *et al.*, 2014). Em conjunto

esses trabalhos reforçam a circulação do parasito através da presença de anticorpos específicos na população de primatas não-humanos da Mata Atlântica Brasileira.

1.9 Resposta imune celular anti-malárica em Primatas Não-Humanos

O conhecimento sobre a resposta imune celular de Primatas não-humanos infectados por *Plasmodium* sp., é limitado e baseado em infecções experimentais por *Plasmodium cynomolgi*, espécie filogeneticamente próxima do *P. vivax* que infecta naturalmente PNH do velho mundo. Esses estudos demonstraram que a infecção primária aguda em macacos rhesus é caracterizada por um perfil Th1/pró-inflamatório, durante o aumento da parasitemia os animais apresentavam um alta expressão de IFN- γ , IL-12 e TNF- α que altera progressivamente para Th2 com um aumento de IL-4, após a reinfeção (Praba-Egge *et al.*, 2002). Entretanto, neste modelo a infecção não se torna crônica, a resposta antimalárica crônica em PNH tem sido caracterizada no modelo rhesus infectado pelo *P. knowlesi* (Collins, 1988), que é evolutivamente mais distante de *P. vivax*.

Os primatas não-humanos neotropicais dos gêneros *Saimiri* e *Aotus* são recomendados pela Organização Mundial da Saúde como modelos experimentais para o estudo da malária humana, pois esses animais podem ser infectados pelo mesmo *Plasmodium* que causa a malária em humanos (Langermans *et al.*, 2000; Jordan-Villegas *et al.*, 2005; Shaw-Saliba *et al.*, 2016). No entanto, uma grande limitação é a falta de ferramentas imunológicas para avaliar a resposta imune nesses modelos (Riccio *et al.*, 2015). Não se tem relato na literatura de estudos que avaliam a resposta celular em PNH naturalmente infectados por *Plasmodium* sp. Diante disso, avaliar a resposta imune celular em animais naturalmente infectados nos auxilia a entender e caracterizar os mecanismos imunológicos envolvidos contra o parasito da malária nesses animais.

1.10 Curso da Infecção Natural de *Plasmodium* em Primatas Neotropicais

Em relação às infecções naturais, o que sabemos é que uma infecção por *P. simium* é caracterizada por baixa parasitemia, no entanto, a parasitemia pode aumentar após a esplenectomia (Deane, 1964). Na maioria das vezes, a infecção é autocontrolada após algumas semanas, mas em alguns casos os animais evoluem para a morte por causa do aumento da parasitemia. Os sintomas observados em macacos bugios foram febre (até 41,5°C), perda de peso, perda de pelo e diarreia. A infecção foi mais frequentes em adultos do que em animais imaturos, e a maioria dos macacos idosos não apresentava parasitas sanguíneos, embora pudessem apresentar pigmento malárico em esfregaços de baço (Deane, 1967). No entanto, nos

animais que foram submetidos à esplenectomia, observou-se que a infecção experimental por *Plasmodium* spp. pode causar fraqueza, febre, anemia, icterícia e insuficiência renal (Galland *et al.*, 2000; Fuentes-Ramírez *et al.*, 2017).

Em 2014, nosso grupo descreveu pela primeira vez uma infecção por *Plasmodium* com sintomas sugestivos de malária em um bugio ruivo (*Alouatta g. clamitans*) do cativeiro do Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial (CEPESBI), em Indaial, Santa Catarina, caracterizando o caso do ponto de vista clínico, parasitológico, molecular e imunológico (Costa *et al.*, 2014). Mais recentemente, Nunes e colaboradores (2019) observaram alterações hematológicas (aumento de linfócitos) e bioquímicas (aumento da enzima hepática alanina aminotransferase -ALT) nos bugios ruivos de vida livre de Joinville-SC, infectados por *Plasmodium* sp. em comparação com os animais não infectados. A malária em primatas neotropicais é subpatente, crônica e geralmente assintomática, devido, provavelmente, a uma modulação do sistema imune dos primatas não humanos (Taliaferro, 1932; da Fonseca, 1951, Stokes *et al.*, 1983). Essa provável modulação explicaria por que bugios naturalmente infectados geralmente não apresentam sinais clínicos. No caso específico descrito pelo nosso grupo, o animal havia sido remanejado de seu recinto para outro local, durante a reforma e melhoria de seu ambiente de cativeiro. A mudança de recinto pode ter causado estresse e, conseqüentemente, uma queda na imunidade do animal. Paralelamente, essa condição de baixa imunidade pode estar relacionada com o aumento da parasitemia, e conseqüentemente, com o surgimento dos sinais relacionados à malária.

O curso da infecção experimental por *Plasmodium brasilianum* varia de acordo com a espécie do hospedeiro, desde infecção crônica não fatal a infecções fatais agudas (Taliaferro & Taliaferro, 1932; 1934). Em *Cebus capucinus* e *Ateles* (*A. geoffroyi* e *A. dariensis*) a infecção é geralmente aguda; e em macacos bugios (*Alouatta palliata*) é mais crônica. Os hospedeiros têm diferentes influências no sincronismo do parasita, na duração do ciclo assexuado, no número de merozoítos e na morfologia dos parasitas, determinando, portanto, o desenvolvimento da infecção e a latência (Taliaferro & Taliaferro, 1944).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a proximidade genética entre *Plasmodium simium* e *P. vivax* e entre *P. brasilianum* e *P. malariae*, o estudo dessas espécies nos auxilia a entender a resposta imune dos primatas neotropicais naturalmente infectados e a circulação desses parasitos na Mata Atlântica brasileira. Entretanto, existem poucos estudos utilizando animais naturalmente infectados por *P. simium* e por *P. brasilianum* e um número ainda menor se refere ao estudo da resposta imune nessas infecções naturais. Assim o estudo utilizando as espécies de diferentes famílias desses primatas não-humanos vai nos possibilitar entender melhor quais dessas espécies podem ser o reservatório da doença e se essas duas espécies de plasmódio em seus hospedeiros naturais podem ser modelos interessantes para o estudo da imunidade da malária humana. Desta forma podemos contribuir para o desenvolvimento de estratégias de controle, tais como o desenvolvimento de fármacos e de novos candidatos vacinais. Outra vertente importante é o estudo do impacto dessas infecções para auxiliar na conservação de diferentes espécies Primatas não-humanos, considerando que diversas se encontram ameaçadas de extinção.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a resposta imune contra malária em primatas neotropicais na Mata Atlântica brasileira.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a resposta de IgG contra os antígenos da fase pré-eritrocítica e eritrocítica de *Plasmodium* sp. em primatas neotropicais da Mata Atlântica brasileira.
2. Avaliar a resposta de IgM contra os antígenos da fase pré-eritrocítica e eritrocítica de *Plasmodium* sp. em primatas neotropicais da Mata Atlântica brasileira.
3. Correlacionar as respostas de anticorpos com parâmetros potencialmente associados à resposta imune: vida livre/cativeiro, idade, sexo e infecção ativa (PCR+).
4. Avaliar associações entre a resposta imune humoral contra antígenos pré-eritrocíticos e os diferentes antígenos eritrocíticos.
5. Comparar as respostas de anticorpos dos PN das diferentes famílias.
6. Padronizar um ensaio de citometria de fluxo para caracterização de subpopulações de células T responsáveis pela resposta imune adaptativa em primatas neotropicais naturalmente expostos a *Plasmodium* sp.

4. METODOLOGIA

Este trabalho avaliou três áreas de estudo, no qual foram coletadas amostras de sangue e soro/plasma de primatas não-humanos (PNHs), Entre janeiro de 2008 à dezembro de 2019, no estado de Santa Catarina (SC), nos municípios de Indaial, em colaboração com o Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial (CEPESBI), e Joinville em colaboração com Núcleo de Educação Ambiental do Condomínio Perini Business Park. E no estado do Rio de Janeiro (RJ), no município de Guapimirim em colaboração com o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ).

4.1 Descrição das áreas de estudo em Santa Catarina

4.1.1 Indaial

A primeira área do estudo, está no município de Indaial, Santa Catarina, que apresenta o bioma Mata Atlântica. Este município é atravessado pelo Rio Itajaí-Açú e localiza-se a uma latitude $26^{\circ} 53' 52''$ sul e a uma longitude $49^{\circ} 13' 54''$ oeste (FIGURA 8). As coletas foram realizadas no Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial (CEPESBI) e no Morro Geisler, região de mata atrás do CEPESBI (Figura 8).

Figura 8- Dependências e localização do Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial (PEPESBI) e matas ao seu redor

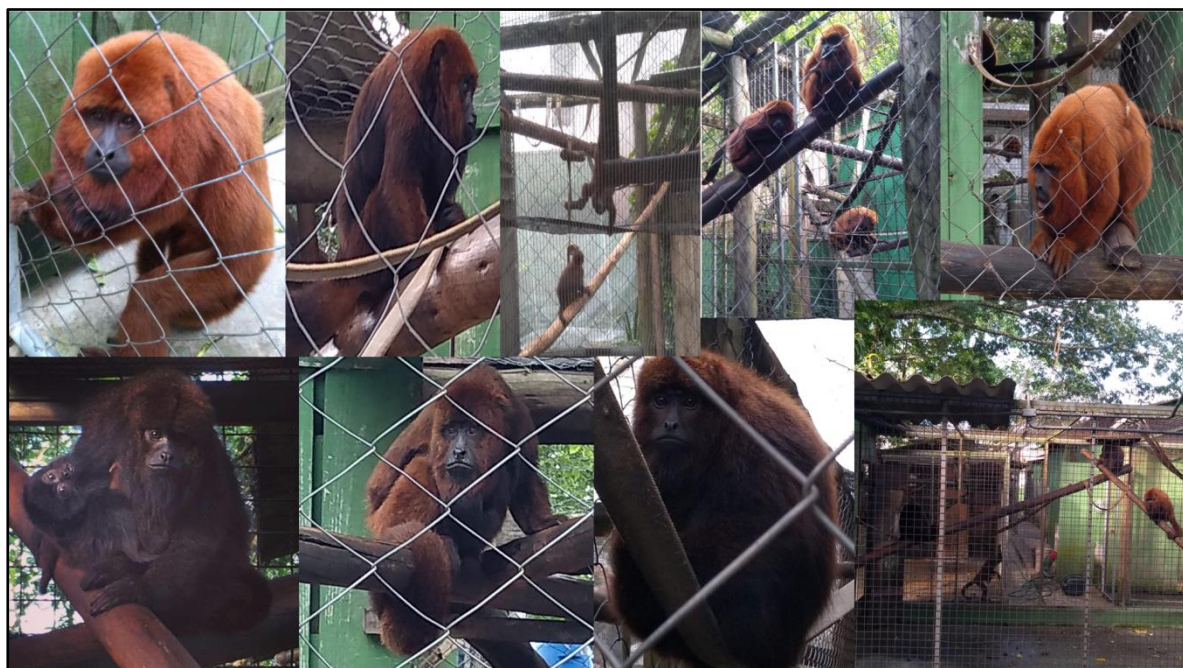


Legenda: Em A, mapa com a localização do CEPESBI e a Mata atlântica ao seu redor (Morro Geisler). B e C, fotos do criadouro do Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial-Projeto Bugio e ao fundo é possível observar o

Morro Geisler). **Fonte:** A, Google Earth Pro. B, Padilha, dissertação, 2015. C, imagem retirado do Google Map (acessado 27/08/2020 as 11:52).

O CEPESBI recebe com frequência animais machucados e vítimas de acidentes (eletrocussão, ataque de cão e atropelamentos) de Indaial e região. Os animais recebidos são tratados e posteriormente devolvidos para a área onde foram capturados, de forma a serem reintroduzidos em seu habitat natural. O criadouro científico de animais silvestres do CEPESBI (registro IBAMA nº. 1/42/98/000708-90) é o único no Brasil especializado na subespécie e ao longo de 30 anos de atividade já recepcionou mais de 100 exemplares de bugios. Neste estudo, foram realizadas coletas de 63 nos animais que residem ou residiram no CEPESBI (Figuras 8 e 9) e 12 de vida livre (coletados no Morro Geisler ou animais recepcionados no CEPESBI que foram resgatados na região) (Figura 9A). As Tabelas 1 e 2 apresentam as características dos animais de Santa Catarina incluídos no estudo.

Figura 9- Imagens de diferentes *Alouatta glamitans clamitans* de cativeiro do Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial (CEPESBI), Indaial, SC



Fonte: Assis, 2018 e 2019.

Tabela 1- Descrição das amostras obtidas dos bugios ruivos (*Alouatta g. clamitans*) de cativeiro do Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial (CEPESBI), Indaial, Santa Catarina.

Código do animal	Nome	Sexo ^a	Idade ^b	Data da coleta das amostras	Local de Origem/ Procedência do animal	Tempo no cativeiro ^c
BL01*	Gaspar	M	Adulto	26/10/2010 04/10/2019*	Gaspar/vida livre	1
BL02*	Maitai	M	Adulto	26/10/2010 04/10/2019*	Indaial/vida livre	4
BL10	Coquinho	M	Adulto	04/04/2011	Blumenau/vida livre	8
BL11*	Cris	F	Adulto	04/04/2011 03/10/2019*	Lages/vida livre	4
BL12	Pingo	M	Adulto	09/04/2011	Indaial/desconhecida	12
BL13	Joana	F	Adulto	09/04/2011	São Bento do Sul/vida livre	2
BL14	Sharon	M	Adulto	09/04/2011	Brusque/vida livre	8
BL15*	Ozzy	M	Não Adulto	09/04/2011 03/10/2019*	Timbó/vida livre	3
BL16*	Madu	M	Adulto	09/04/2011 03/10/2019*	Laguna/vida livre	9
BL17	Ibirama	F	Adulto	09/04/2011	Ibirama/cativeiro ilegal	5
BL18*	Gucki	M	Adulto	09/04/2011 03/10/2019*	São Bonifácio/vida livre	10
BL22	Bambino	M	Adulto	09/04/2011	Rodeio/cativeiro ilegal	4
BL25	Lion	M	Adulto	11/04/2011	Blumenau/vida livre	8
BL30	Panduva	F	Adulto	12/04/2011	Panduva/cativeiro ilegal	9
BL31*	Laguna	F	Adulto	12/04/2011 03/10/2019*	Laguna/desconhecida	10
BL32*	Vitoria	F	Adulto	12/04/2011 01/10/2019*	Rodeio/vida livre	7
BL33*	Rodi	F	Adulto	12/04/2011 03/10/2019*	Pomerode/zoológico	11
BL34	Bimbo	F	Adulto	05/11/2011	Ascurra/cativeiro ilegal	10
BL35*	Kalvin	F	Adulto	12/04/2011 02/10/2019*	Lages/desconhecido	8
BL36	Ibirama	F	Adulto	12/04/2011	Ibirama/cativeiro ilegal	7
BL37	Hit	M	Adulto	18/05/2013	Blumenau/vida livre	2
BL38	Kali	M	Adulto	06/07/2011	Massaranduba/cativeiro ilegal	11
BL39	Nino	M	Adulto	06/07/2011	Desconhecida/desconhecida	12
BL40	Maçon	M	Adulto	06/07/2011	Indaial	3
BL41	Frida	F	Adulto	06/07/2011	Blumenau/desconhecida	7
BL42*	Tedy	M	Adulto	06/07/2011 30/09/2019*	Indaial/vida livre	8
BL43*	Jack	M	Adulto	06/07/2011 04/10/2019*	Campo Alegre/desconhecida	11

BL44*	Sol	F	Adulto	06/07/2011 02/10/2019*	Blumenau	7
BL45*	Scoby	M	Adulto	06/07/2011 02/10/2019*	Indaial/desconhecida	8
BL46	Pepe	M	Adulto	07/07/2011	Garuva/desconhecida	8
BL47	Michael	M	Não adulto	07/07/2011	Indaial/nasceu em cativeiro	3†
BL48	Menina	F	Adulto	07/07/2011	Lages/desconhecida	9
BL49	Cacau	F	Adulto	07/07/2011	Blumenau/desconhecida	12
BL50	Nicki	M	Adulto	07/07/2011	Joinville/desconhecida	11†
BL51	Lili	F	Adulto	07/07/2011	Joinville/desconhecida	5†
BL77	Teddy	M	Adulto	18/10/2013	Indaial/vida livre	9
BL90	João	M	Adulto	24/08/2008	Jaraguá do Sul/cativeiro	2,5†
Bugio 2*@	Kate	F	Não Adulto	30/09/2019*	Indaial/nasceu no CEPESBI	3
Bugio 3*@	Herta	F	Não Adulto	30/09/2019*	Rio dos Cedros	4
Bugio 4*	Boby	M	Adulto	30/09/2019*	Rodeio/vida livre	5
Bugio 5*	Crista	F	Não Adulto	30/09/2019*	Blumenau/vida livre	5
Bugio 6*	Kaly	M	Adulto	30/09/2019*	Massaranduba/cativeiro ilegal	18
Bugio 7*@	Indaiá	F	Adulto	01/10/2019*	Indaial/vida livre	4
Bugio 8*	Lipe	M	Adulto	01/10/2019*	Blumenau/vida livre	5
Bugio 9*	Bernado	M	Não Adulto	01/10/2019*	Blumenau/vida livre	5
Bugio 10*	Sixiviv	F	Não Adulto	01/10/2019*	Pomerode	5
Bugio 12*@	Chicha	F	Adulto	01/10/2019	Indaial/vida livre	8
Bugio 13*	Nowaski	M	Não adulto	01/10/2019*	Blumenau/vida livre	3
Bugio 14*	Franky	M	Não Adulto	01/10/2019*	Blumenau/vida livre	3
Bugio 15*	Barbie	F	Adulto	02/10/2019*	Blumenau/vida livre	4
Bugio 19*	Ades	M	Adulto	02/10/2019*	Blumenau/vida livre	6
Bugio 20*	Selke	F	Não Adulto	02/10/2019*	Pomerode/ vida livre	4
Bugio 21*	Phelps	M	Não Adulto	02/10/2019*	Indaial/ vida livre	4
Bugio 22*@	Zel	F	Adulto	02/10/2019*	Indaial/Nasceu no CEPESBI	9
Bugio 23*	Quoquito	M	Adulto	03/10/2019*	Blumenau/vida livre	6
Bugio 26*	Fredy	M	Adulto	03/10/2019*	Indaial/vida livre	15
Bugio 31*	Reinoldo	M	Adulto	03/10/2019*	Indaial/vida livre	5
Bugio 33*	Mônica	F	Adulto	04/10/2019*	Blumenau/vida livre	4
Bugio 35*	Edy	M	Não adulto	04/10/2019*	Blumenau/vida livre	2
Bugio 36*	Feijão	M	Adulto	04/10/2019*	Indaial/vida livre	7
Bugio 37*@	Bauer	M	Adulto	04/10/2019*	Blumenau/vida livre	2

Massaranduba	Massaranduba	F	Adulto	25/05/2011	-	-
Bugio 11 01	Bugio 01 11	M	Adulto	11/12/2008	-	-

^a:Sexo: F: Fêmea, M: Macho

^b: Idade estimada de acordo com Carpenter, 1965: Adulto: incluem animais adultos e subadultos; Não adulto: Juvenis;

^c Tempo em anos

† Óbito.

ND: não declarado - sem informação.

* Também houve coleta de amostras para separação de PBCMs.

@ PBMCs utilizado para padronização do painel de citometria

Tabela 2 - Descrição das amostras obtidas dos bugios ruivos de vida livre capturados no estado de Santa Catarina

Nº de identificação	Número de controle	sexo ^a	Idade ^b	Data da coleta das amostras	Origem	Tipo de busca/ocorrência
BL64	233 (Deane)	M	Adulto	18/04/2012	Pomerode	Busca passiva/atropelamento
BL62	Quity	F	Não Adulto	26/06/2012	Blumenau	Busca passiva
BL68	234	F	Adulto	12/05/2012	Blumenau	Busca passiva
BL69	235	F	Adulto	18/05/2012	Blumenau	Busca passiva/atropelamento†
BL83	Grupo 13	F	Adulto	ND	Morro Geisler/Indaial	Busca Ativa
BL84	247	M	Adulto	15/07/13	Pomerode	Busca passiva
BL85	Raissa	F	Adulta	07/03/2010	Pomerode	ND
BL86	200	F	Adulto	06/04/2011	Blumenau	Busca passiva/†
BL87	ND	F	Adulto	ND	Massaranduba	Busca passiva/eletrocussão
BL91	239	F	Adulto	15/01/2013	Blumenau	Busca passiva
BL92	238	F	Adulto	15/08/2012	Blumenau	Busca passiva
Bugio SARA	Saraí	M	Adulto	11/10/2019	Timbó	Busca passiva
Bugio 432#@	Bovis	M	Adulto	01/10/2019#	Pomerode	Busca passiva/atacado por Bovino

^a:Sexo: F: Fêmea, M: Macho

^b. Idade estimada de acordo com Carpenter, 1965: Adulto: incluem animais adultos e subadultos; Não adulto: Juvenis;

†Óbito.

ND: não declarado - sem informação.

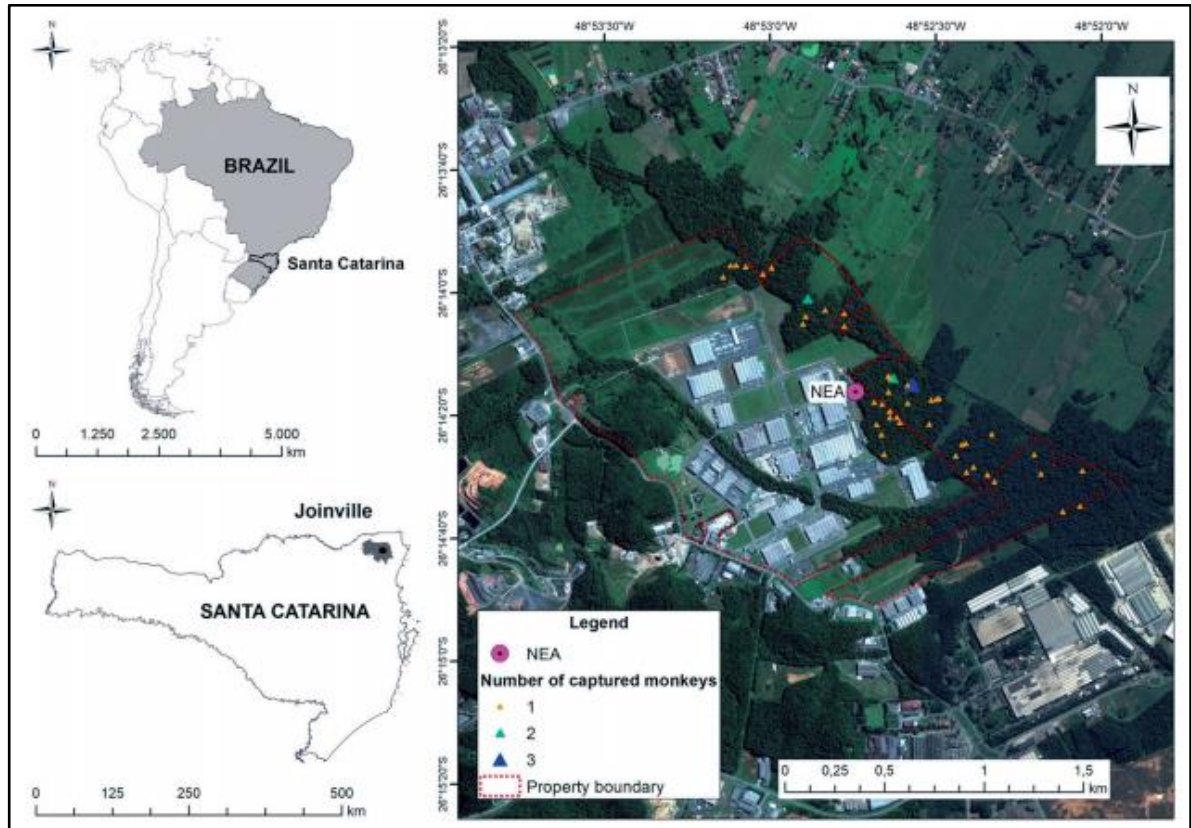
Somente coleta de PBMCs

@ PBMCs utilizado para padronização do painel de citometria

4.1.2 Joinville

A segunda área de estudo, também localiza-se no estado de Santa Catarina, no município de Joinville, que apresenta o bioma de Mata Atlântica. Localiza-se a uma latitude 26° 14' 41.78" sul e a uma longitude 48° 53'02.87" oeste . Foram coletadas amostras de sangue e plasma de 39 *Alouatta guariba clamitans* de vida livre capturados durante um estudo comportamental realizado em uma região remanescente de Mata Atlântica, localizada dentro de uma área industrial, em uma colaboração com Núcleo de Educação Ambiental do Condomínio Perini Business Park, Joinville, SC (Figura 10).

Figura 10- Localização do fragmento de floresta e local onde foram capturados os *Alouatta guariba clamitans* de vida livre, na cidade de Joinville, Santa Catarina, Sul do Brasil.



Legenda: NEA = laboratório. Os triângulos representam os locais onde um (amarelo), dois (verdes) ou três (azuis) macacos foram capturados. A área delimitada por linha tracejada vermelha corresponde à propriedade do Parque Empresarial Perini onde o estudo foi desenvolvido. **Fonte:** Nunes *et al.*, 2019.

A tabela 3 apresenta as características dos animais de Santa Catarina incluídos no trabalho. O estudo teve autorização do Sisbio/ICMBio (nº. 57756731).

Tabela 3 - Descrição das amostras de *Alouatta guariba clamitans* de vida livre capturados na cidade de Joinville, Santa Catarina

Código do animal	Chip do animal	sexo^a	Idade^b	Data da coleta das amostras
1 PCBR	900032001018776	F	Adulto	07/07/2015
2 PCBR	900032001018775	F	Adulto	09/07/2015
3 PCBR	900032001018774	M	Adulto	10/07/2015
4 PCBR	900032001018763	M	Adulto	10/07/2015
5 PCBR	900032001018765	M	Adulto	10/07/2015
6 PCBR	900032001018771	F	Adulto	10/07/2015
9 PCBR	900032001018773	M	Adulto	10/07/2015
10 PCBR	900032001018772	M	Adulto	10/07/2015
11 PCBR	900032001018779	F	Não Adulto	10/07/2015
12 PCBR	900032001018764	F	Adulto	10/07/2015
13 PCBR	900032001018778	M	Adulto	10/07/2015
14 PCBR	900032001018769	F	Adulto	10/07/2015
15 PCBR	900032001018766	M	Adulto	10/07/2015
16 PCBR	900032001018780	F	Adulto	10/07/2015
17 PCBR	900032001018770	F	Adulto	10/07/2015
18 PCBR	900032001018767	M	Adulto	10/07/2015
19 PCBR	900032001018777	F	Adulto	10/07/2015
20 PCBR	900032001014717	F	Não Adulto	10/07/2015
21 PCBR	900032001014716	M	Não Adulto	10/07/2015
22 PCBR	900032001014719	F	Adulto	10/07/2015
23 PCBR	900032001014703	M	Adulto	10/07/2015
24 PCBR	900032001014709	M	Não Adulto	10/07/2015
25 PCBR	900032001014720	F	Não Adulto	10/07/2015
26 PCBR	900032001014701	M	Não Adulto	10/07/2015
27 PCBR	900032001014712	F	Adulto	10/07/2015
28 PCBR	Xx	F	Não Adulto	10/07/2015
29 PCBR	900032001014705	F	Adulto	10/07/2017
31 PCBR	900032001014714	M	Adulto	10/07/2017
32 PCBR	900032001014706	F	Adulto	10/07/2017
33 PCBR	900032001014718	F	Adulto	11/07/2017
35 PCBR	900032001014704	M	Não Adulto	13/03/2017

36 PCBR	900032001014711	F	Adulto	14/07/2017
37 PCBR	900032001014707	M	Adulto	05/08/2017
41 PCBR	900032001014715	M	Adulto	02/09/2017
43 PCBR	900032001018508	M	Adulto	10/11/2017
45 PCBR	900032001018507	F	Adulto	12/11/2017
46 PCBR	900032001018762	M	Adulto	05/12/2017
47 PCBR	900032001018768	F	Adulto	07/12/2017
49 PCBR	900032001014710	F	Adulto	08/12/2017

^a:Sexo: F: Fêmea, M: Macho

^b: Idade estimada de acordo com Carpenter, 1965: Adulto: incluem animais adultos e subadultos; Não adulto: Juvenis;

4.4 Amostras de Primatas Neotropicais

De cada animal foram coletados cerca de 2-5 mL de sangue em tubos contendo Heparina sódica ou EDTA, ou tubo ativador de coágulo por punção da veia femoral. Durante o procedimento os animais foram sedados com Quetamina® e Midazolam. Inicialmente as amostras de sangue total foram centrifugadas 350 \times g por 10 minutos para a obtenção do plasma na presença do anticoagulante e o soro no tubo sem anticoagulante. Alíquotas de 500 μ L de plasma foram armazenadas em -20 °C para realização da sorologia.

O sangue coletado com EDTA foi utilizado para extração de DNA através do QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Minneapolis, EUA) ou Kit Puregene®, Gentra Systems Blood kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) para confirmação de uma infecção ativa, por diagnóstico molecular e separação plasma e de células mononucleares para as análises imunológicas.

4.2 Descrição da área de estudo no Rio de Janeiro

A terceira área de estudo foi o Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ). O CPRJ (número de registro do IBAMA 458460) é uma unidade de proteção de primatas localizado no município de Guapimirim, na Serra dos Órgãos, em uma área de Mata Atlântica, a cerca de 100 km da cidade do Rio de Janeiro. Localizado a 22°29'18.28" de latitude sul e 42°54'48.43" de longitude oeste, 70% do município encontra-se em área de proteção ambiental coberto pela Mata Atlântica.

O CPRJ mantém em cativeiro cerca de 250 primatas de pequeno e médio porte com representantes de todas as famílias de primatas neotropicais (Cebidae, Aotidae, Pitheciidae,

Atelidae e Callitrichidae), distribuídos em 85 viveiros ocupando uma área de aproximadamente de 264.920 hectares próximos à mata (FIGURA 11).

Figura 11 - Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ): localização, seus cativeiros e alguns exemplares de primatas neotropicais.



Fonte: Google Earth Pro e Assis, 2019.

Foram coletadas amostras de sangue e plasma de 40 animais de cativeiro pertencentes a todas as famílias Platyrrhini (Tabela 4).

Tabela 4 - Descrição das amostras obtidas dos primatas neotropicais de cativeiro CPRJ, Guapimirim, RJ

Código do animal	Família de PNH	Espécie de PNH	sexo ^a	Idade ^b	Data da Coleta	Local de Origem/ Vida Livre	Tempo de cativeiro ^c
1624	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	M	Adulto	01/11/2011	Nascido CPRJ	16
2005*	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	Adulto	21/11/2011 20/02/2019*	Ilheus-BA	11
2046	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	Adulto	01/11/2011	Nascido no CPRJ	9
2098*	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	Adulto	28/01/2015 20/02/2019*	Nascido no CPRJ	12
2110	Cebidae	<i>Sapajus robustos</i>	F	Adulto	01/11/2011	Capturado em Belo Horizonte/MG	4
2125	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	Adulto	21/11/2011	Nascido no CPRJ	8
2135	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	Adulto	21/11/2011	Nascido no CPRJ	7
2183	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	Adulto	21/11/2011	Nascido no CPRJ	6
2203* [@]	Aotidae	<i>Aotus nigriceps</i>	M	Adulto	21/11/2011 20/02/2019*	Criadouro Velho Jatobá/Sorocaba-SP	11
2207	Cebidae	<i>Sapajus robustus</i>	M	Adulto	21/11/2011	Porto Seguro/Veracell	6
2297*	Cebidae	<i>Sapajus robustus</i>	F	Adulto	29/01/2015 20/02/2019*	Nasceu no CPRJ	11
2299	Callitrichidae	<i>Saguinus midas</i>	M	Adulto	21/11/2011	Cachoeira de Macacu/RJ	4
2324* [@]	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	Adulto	21/11/2011 20/02/2019*	Nascido no CPRJ	3
2359	Callitrichidae	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	F	Adulto	01/11/2011	Nascido no CPRJ [†]	4
2360*	Cebidae	<i>Sapajus robustus</i>	F	Adulto	21/11/2011 20/02/2019*	Nascido no CPRJ	4
2388	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	M	Adulto	21/11/2011	Nasceu no CPRJ	4
2392	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	F	Adulto	21/01/2011	Nasceu no CPRJ	3
2443* [@]	Atelidae	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	M	Adulto	21/11/2011 20/02/2019*	Cachoeira de Macacu/RJ	2
2466	Pitheciidae	<i>Callicebus personatus</i>	F	Adulto	21/01/2011	Selvagem apreendido em Belo Horizonte/ Zoo Sorocaba	1
2501	Cebidae	<i>Cebus sp.*</i>	M	Adulto	01/11/2011	Parque dos Pássaros em Rio das Ostras/RJ	2
2503* [@]	Cebidae	<i>Cebus sp.*</i>	F	Adulto	21/11/2011 20/02/2019*	Viçosa/MG	1
2504	Cebidae	<i>Cebus sp.*</i>	F	Adulto	21/11/2011	Viçosa/MG [†]	1
2536	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	M	Adulto	21/11/2011	Nasceu no CPRJ	1
2559	Cebidae	<i>Cebus sp.*</i>	F	Adulto	21/11/2011	Bom Jardim/RJ [†]	5

2576* [@]	Atelidae	<i>Alouatta Caraya</i>	M	Adulto	21/11/2011 20/02/2019*	Recreio dos Bandeirantes - Estância da Sá - RJ	9
2456	Cebidae	<i>Sapajus nigritus robustus</i>	M	Adulto	21/11/2011	Nascido no CPRJ	2
2049*	Atelidae	<i>Brachyteles arachnoides</i>	F	Adulto	20/02/2019*	Orquidario de Santo/SP	18
2263*	Atelidae	<i>Brachyteles arachnoides</i>	M	Adulto	20/02/2019*	Nascido no CPRJ [†]	12
2302* [@]	Pitheciidae	<i>Cacajao melanocephalus</i>	F	Adulto	20/02/2019*	Manaus/AM	12
2390*	Callitrichidae	<i>Mico humeralifer</i>	M	Adulto	20/02/2019*	Nascido no CPRJ	10
2435*	Callitrichidae	<i>Leontopithecus rosalia</i>	M	Adulto	20/02/2019*	Nascido no CPRJ	9
2564*	Cebidae	<i>Sapajus robustus</i>	M	Adulto	20/02/2019*	Nascido no CPRJ	7
2620*	Pitheciidae	<i>Cacajao melanocephalus</i>	F	Adulto	20/02/2019*	Manaus/AM	7
3078*	Atelidae	<i>Brachyteles arachnoides</i>	M	Adulto	20/02/2019*	Nascido no CPRJ	4
2619*	Atelidae	<i>Ateles paniscus</i>	F	Adulto	20/02/2019*	Manaus/AM	7
2539	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternus</i>	M	Adulto	30/10/2019	Nascido no CPRJ	8
2592	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternus</i>	M	Adulto	30/10/2019	Nascido no CPRJ	7
2208	Cebidae	<i>Sapajus robustus</i>	F	Adulto	30/10/2019	Porto Seguro/Veracell	14
3636	Atelidae	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	M	Adulto	25/10/2019	Vida livre/ Macaé	3
3622	Atelidae	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	F	Adulto	25/10/2019	Vida livre/ Itaocara	3

*Híbrido,

^a:Sexo: F: Fêmea, M: Macho

^b Idade estimada de acordo com Carpenter, 1965: Adulto: incluem animais adultos e subadultos; Não adulto: Juvenis;

^c Tempo em anos

[†]Óbito.

* Também houve coleta de amostras para separação de PBCMs.

[@] PBCMs utilizado para padronização do painel de citometria

4.3 Descrição da área controle de estudo no estado de Minas Gerais

Para obtenção de amostras de controles negativo de primatas neotropicais nunca expostos ao *Plasmodium* sp, foram coletadas 23 amostras de soros e plasmas de PN de todas as famílias de primatas neotropicais da Fundação de Parques Municipais e Zoológica de Belo Horizonte (FPMZ), Minas Gerais, localizado em área sem transmissão de malária (TABELA 5). As amostras foram coletadas entre janeiro de 2013 à janeiro de 2019 e estavam armazenadas na FPMZ.

Tabela 5 - Descrição das amostras obtidas dos primatas neotropicais de cativeiro FPMZ, Belo Horizonte, MG

Código do animal	Família de PNH	Espécie de PNH	Data da Coleta	Procedência
13PM0007S	Callitrichidae	<i>Leontopithecus rosalia</i>	10/01/2023	CPRJ - 16/09/2009
13PM0069S	Atelidae	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	27/03/2013	NATUREZA - CONGONHAS/MG
13PM0131S	Atelidae	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	29/10/2013	FPMZB - 11/08/2013
13PM0148S	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	23/11/2013	FPMZB - 21/12/2011
14PM0113P	Callitrichidae	<i>Leontopithecus rosalia</i>	16/09/2014	FPMZB - 01/04/2014
14PM0115P	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	17/09/2014	FPZSP - 03/04/2011
15PM0032S	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternos</i>	12/03/2015	FPMZB - 12/12/2009
15PM0053S	Atelidae	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	17/04/2015	NATUREZA - CONGONHAS/MG
15PM0078S	Callitrichidae	<i>Leontopithecus rosalia</i>	19/06/2015	FPMZB - 04/12/2013
15PM0079S	Callitrichidae	<i>Leontopithecus rosalia</i>	19/06/2015	FICHA NÃO ENCONTRADA
15PM0080S	Callitrichidae	<i>Leontopithecus rosalia</i>	19/06/2015	FPMZB - 07/09/2013
15PM0090S	Aotidae	<i>Aotus infulatus</i>	7/7/2015	NATUREZA - PUC/MG
15PM0091S	Aotidae	<i>Aotus infulatus</i>	7/7/2015	NATUREZA, CETAS - PORTO VELHO/RO
15PM0124S	Pithechiidae	<i>Chiropotes satanas</i>	11/08/2015	ZOO DE CURITIBA - 23/07/2002
16PM0012S	Atelidae	<i>Lagothrix lagotricha</i>	15/03/2016	NATUREZA, CETAS - PORTO VELHO/RO
16PM0013S	Atelidae	<i>Lagothrix lagotricha</i>	15/03/2016	NATUREZA, CETAS - PORTO VELHO/RO
16PM0014S	Atelidae	<i>Lagothrix lagotricha</i>	15/03/2016	NATUREZA, CETAS - PORTO VELHO/RO
16PM0015S	Atelidae	<i>Lagothrix lagotricha</i>	15/03/2016	NATUREZA, CETAS - PORTO VELHO/RO
16PM0016S	Atelidae	<i>Lagothrix lagotricha</i>	15/03/2016	NATUREZA, CETAS - PORTO VELHO/RO
17PM0001S	Pithechiidae	<i>Pithecia irrorata irrorata</i>	23/01/2017	NATUREZA, CETAS - MANAUS/AM (PASSOU UM TEMPO NO CPRJ ANTES DE VIR PARA BH)
17PM0026P	Atelidae	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	03/04/2017	APREENSÃO DO IBAMA, ZOO DE VARGINHA/MG
19PM0004S	Atelidae	<i>Ateles paniscus</i>	09/01/2019	FICHA NÃO ENCONTRADA
19PM0004P	Atelidae	<i>Ateles paniscus</i>	09/01/2019	FICHA NÃO ENCONTRADA

4.5 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita previamente realizada (Costa *et al.*, 2014; de Alvarenga *et al.*, 2015; Alvarenga *et al.*, 2017; de Alvarenga *et al.*, 2018; Nunes *et al.*, 2020) e nas amostras coletadas em 2019 neste trabalho. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o QIAamp DNA mini kit (Qiagen Minneapolis, EUA) ou Kit Puregene®, Gentra Systems Blood kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, para cada 300 µL de sangue total foram acrescentados 900 µL de solução de lise para eritrócitos. A mistura foi incubada por 1 minuto à temperatura ambiente e então centrifugada a 13000 x g, por 20 segundos. O sobrenadante foi então removido e o material ressuspenso em 300 µL de solução de lise celular, sendo o material submetido por 10s em agitador de tubos (vórtex). Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução de precipitação de proteína, sendo o material submetido por 20s no vórtex, e centrifugado a 13000 x g, por 1 minuto a 25 °C. O sobrenadante contendo o DNA solúvel foi precipitado em um tubo contendo 300 µL de isopropanol P.A. (Merck). O tubo foi invertido cerca de 50 vezes até o DNA ficar visível. Em seguida, o DNA foi centrifugado a 13000 x g, por 1 minutos, a 25 °C, sendo o sobrenadante descartado e vertido o tubo para completa evaporação. Foi adicionado 300 µL de etanol 70% gelado para a lavagem do DNA seguido de centrifugação a 13000 x g, por 1 minuto, a 25 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e após a completa evaporação do etanol por aproximadamente 5 min, o DNA foi hidratado com 30 µL de solução de hidratação (Tris-hidrometil aminometano, EDTA) e incubado por 1 hora, a 65°C e o DNA extraído foi armazenado a -20 °C até o seu uso.

4.6 Diagnóstico molecular: reação em cadeia da polimerase (PCR)

4.6.1 Nested-PCR

As amostras de DNA dos primatas neotropicais foram submetidas à Nested-PCR (Snounou *et al.*, 1993), que amplifica na primeira reação um fragmento gênero-específico de 1200 pb do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal utilizando-se os iniciadores rPLU5 e rPLU6. Na segunda reação, sequências espécie-específicas são amplificadas, no qual se utilizam pares de iniciadores específicos (rFAL1-rFAL2, rVIV1-rVIV2, rMAL1-rMAL2 para *P. falciparum*, *P. vivax*, e *P. malariae*, respectivamente). Os iniciadores estão apresentados na Tabela 5. As reações foram realizadas em volumes de 20 µL utilizando-se: 1-2 µL de DNA, 0,25 µM de cada um dos iniciadores, 10 µL de Master Mix (Promega-0,3 U Taq DNA Polimerase, 200 µM de cada um dos dNTPs e 1,5 mM de MgCl₂).

As ampliações foram realizadas no termociclador PTC-100™ Version7.0 - MJ Research e as condições da PCR foram, para a primeira reação: um ciclo de 95 °C por cinco minutos, 24 ciclos de 58 °C por dois minutos, 72 °C por dois minutos e 94 °C por um minuto, seguidos de um passo final de 58 °C por dois minutos, 72 °C por cinco minutos e 4 °C por tempo ilimitado. A segunda reação foi realizada nas mesmas condições, porém com 29 ciclos, utilizando-se 1 µL do produto amplificado da primeira reação como DNA molde.

A visualização dos fragmentos amplificados foi feita em eletroforese em gel contendo 2% de agarose (Invitrogen) dissolvida em tampão TAE 1x (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA), sendo adicionados 5 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen). As amostras de DNA foram misturadas ao tampão de amostra Orange 5X (Amaranjado G da VETEC e Ficol da Sigma) e aplicadas em cada uma das canaletas do gel de agarose. A corrida eletroforética foi realizada em um sistema horizontal (Bio-Rad) a 100V, por cerca de 30 minutos em TAE 1X. O gel foi analisado em transluminador ultravioleta (UVP - Bio-Doc it System).

4.6.2 Nested PCR/RFLP

As amostras de DNA também foram submetidas à Nested-PCR/RFLP baseando-se na metodologia descrita por Alvarenga e colaboradores (2018), que tem como alvo o gene mitocondrial *COX1*. Na primeira reação se utiliza os iniciadores PsimOUTF e PsimINR e na segunda reação, PsimEDF PsimEDR. Os iniciadores estão apresentados na Tabela 5. A primeira reação foi realizada em volumes de 20 µL contendo 0,5 µM de cada iniciador de oligonucleotídeo, 2 µL de DNA, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, 5 U/µL), 0,2 mM de cada um dos dNTPs e 1,5 mM de MgCl₂. Os ensaios de PCR foram realizados em um termociclador (Veriti 96 poços, Applied Biosystems) com os seguintes parâmetros de ciclo: uma desnaturação inicial em 94°C por 2 min seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 20 segundos e extensão a 72° C por 30 segundos, seguido por uma incubação de extensão final a 72°C por 2 minutos e 4°C por tempo ilimitado. Para a segunda PCR, 2 µL do produto primário foi usado como molde. Os parâmetros de ciclagem para a segunda rodada de PCR foram iguais aos da primeira rodada.

Os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em géis de agarose 2% em tampão TAE 1x (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) com 5 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen) em sistema horizontal (Bio-Rad) a 100 V por 30 minutos. Géis foram examinados no transluminador UV (UVP - Bio-Doc System it).

Após a amplificação (confirmada por eletroforese em gel de agarose), os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *HpyCH4III* (New England Biolabs, Ipswich,

MA, USA). A digestão foi realizada em 10 µL contendo 0,5 µL da enzima (5 U/µL), 1 µL do tampão de enzima e 5 µL de produto de PCR (2–7 µL de acordo com a intensidade dos produtos de PCR em géis de agarose). A digestão foi incubada a 37°C durante 3 horas. Todas as reações de digestão e a quantidade equivalente de DNA não digerido foi visualizado em eletroforese em gel de agarose a 3% e examinado em transiluminador de UV.

4.6.3 Controles das reações de PCR e iniciadores utilizados

Em todos os ensaios de PCR foram utilizados controles positivos e negativos nas reações. Os controles positivos utilizados foram: (i) DNA de *P. falciparum*, cepa 3D7 mantida no Laboratório de Malária (IRR-FIOCRUZ MINAS); (ii) DNA de paciente com alta parasitemia para *P. vivax* e DNA de *P. simium* obtido de símio com infecção aguda e parasitemia confirmada pela microscopia óptica (BL10); (iii) DNA de *P. brasilianum* do MR4 (Banco Internacional de Reagentes de Referência de Malária – ATCC, USA). Como controles negativos foram utilizadas amostras DNA de sangue total de humanos não infectados e de Primatas Neotropicais não infectados, além do controle negativo da PCR na ausência de DNA. Os iniciadores utilizados neste estudo estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Iniciadores utilizados no estudo

PCR	Alvo	Iniciadores	Sequências de nucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Referência
Nested 1ª Reação	Gene 18S de <i>Plasmodium</i> sp.	rPLU5	5'CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC3'	1200 pb	Snounou <i>et al.</i> , 1993
		rPLU6	5'TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG3'		
Nested 2ª Reação	Gene 18S de <i>P. vivax</i>	rViV1	5'CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC3'	120 pb	Snounou <i>et al.</i> , 1993
		rViV2	5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT3'		
	Gene 18S de <i>P. falciparum</i>	rFAL1	5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT3'	205 pb	
		rFAL2	5'ACACAATGAACTTCAATCATGACTACCCGTC3'		
	Gene 18S de <i>P. malariae</i>	rMAL1	5'ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATACCGC3'	144 pb	
		rMAL2	5'AAATCCCATGCATAAAAAATTATACAAA3'		
Nested 1ª Reação	Gene Mitocondrial <i>COX1</i>	PsimOUTF	5'CAGGTGGTGTTTTAATGTTATTATCAG3'		de alvarenga <i>et al.</i> , 2018
		PsimINR	5'ATGTAACAATCCAATAATTGCACC3'		
Nested 2ª Reação	Gene Mitocondrial <i>COX1</i> de <i>Plasmodium</i> sp.	PsimEDF	5'ATCCTACATTTGCTGGAGATCCTA3'	244 bp	
		PsimEDR	5'GCTCTGTATCTACTTCTAAACCTGTAG3'		

4.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando peptídeos sintéticos da Proteína Circunsporozoíta (CSP) de *Plasmodium* sp.

Os ensaios de ELISA foram padronizados em colaboração com a Dra. Joseli Ferreira (IOC), segundo protocolo de Duarte *et al.*, 2006 e Pereira *et al.*, 2018, com modificações. Foram utilizados 5 peptídeos sintéticos que representam repetições de domínios imunes de CSP. As sequências de *P. vivax* foram utilizadas das três variantes: Pvc - *P. vivax* VK210 DGQPAGDRAAGQPAG-(DRADGQPAG)₂, Pvk - *P. vivax* VK247 (ANGAGNQPG)₃-ANGAGN, e Pvl - *P. vivax-like* (APGANQEGGAA)₃. Foram usadas também as sequências de *P. falciparum* (PfCSP) e *P. malariae/P. brasilianum* (Pm/PbCSP) (NANP)₈ e (GNAA)₂-GNDA-(GNAA)₄, respectivamente.

Placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp®) foram sensibilizadas por 12 horas a 4°C em câmara úmida com 50 µL por poço com 10 µg/mL dos peptídeos. Após a incubação, a placa foi lavada quatro vezes com solução de PBST (PBS, 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 50 µL/poço da solução de bloqueio (PBST, 5% de BSA). Após 1 hora, as placas foram vertidas para a retirada do excesso de solução e incubadas em câmara úmida a 37°C com 50 µL de

plasma diluído a 1:50 em tampão PBST contendo 2,5% de BSA, em duplicata. Após 1 hora de incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com 150 µL/poço de PBST e incubadas por 1 hora com 50 µL/poço do conjugado anti- IgM de humano à peroxidase (Jackson Immunoresearch) na diluição de 1: 2500 em PBST com 2,5% BSA ou na diluição 1:3000 anti-IgG de *Macaca mulata* ligado à peroxidase (Sigma-Aldrich). Após a lavagem, a reação foi revelada com dicloridrato de ortofenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldrich) diluído em 50 mL de tampão 0,1 M citrato de sódio pH 5,0, contendo 40 µL de peróxido de hidrogênio a 30% (Merck Millipore). Após 20 minutos, a reação foi interrompida com 25 µL de solução 2N ácido sulfúrico. A densidade ótica foi avaliada usando filtro de 490nm (DO490nm) em leitor automático de ELISA (Spectra Max 340PC 384, Molecular Devices). Os resultados foram expressos pelo Índice de Reatividade (IR) que foi calculado dividindo os valores médios de DO das amostras testadas pela média mais três desvios padrão (DP) de amostras de 3 Bugios Ruivos (*Alouatta guariba clamitans*) da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte, Minas Gerais, localizado em área sem transmissão de malária. Esses animais se mostraram negativos no diagnóstico molecular antes do início dos experimentos. Essa espécie foi escolhida por representar 77% dos animais presentes neste estudo. Foram considerados positivos animais com $IR > 1$. Os *cut-off* para os peptídeos foram, Pvc: 0,532 e 0,128; Pvk: 1,20 e 0,157; Pvl: 0,660 e 0,152; Pf: 0,442 e 0,181; Pb/Pm: 0,785 e 0,151, para IgM e IgG respectivamente.

4.8 Ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando os antígenos da fase sanguínea

Os ensaios de ELISA foram realizados segundo protocolo descrito por Ceravolo *et al.*, 2005, Kano *et al.*, 2012, Pires *et al.*, 2018, Monteiro *et al.*, 2020 e Medeiros *et al.*, 2020, com modificações, sendo que a concentração de antígenos recombinantes e diluições dos anticorpos primários e secundários, foram determinados durante deste trabalho por titulação. Foram utilizados apenas antígenos de *P. vivax* pela sua alta prevalência no país e pela disponibilidade desses antígenos no laboratório dos estudos de resposta imune humana.

A proteína recombinante AMA-1 (*Apical Merozoite antigen - 1*) foi gentilmente cedida pela colaboradora Irene Soares do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo - USP. A proteína DBPII (*Duffy Binding Protein region II*) Sal1 (variante Salvador-I) foi produzida pelo nosso grupo segundo protocolo publicado previamente (Ceravolo *et al.*, 2005). A proteína recombinante EBP-2 (*Erythrocyte Binding Protein 2*), foi produzida por um dos membros do nosso grupo de pesquisa durante o seu doutorado sanduiche no laboratório do Dr. John Adams, na Universidade do sul da Flórida/EUA, seguindo o protocolo publicado

(Ntumngia *et al.*, 2016). E as proteínas recombinantes *Merozoite surface protein 1*₁₉ (MSP1₁₉) de *P. vivax* (PvMSP1₁₉), *P. malariae* (PmMSP1₁₉) e *P. falciparum* (PfMSP1₁₉), foram gentilmente cedida pela colaboradora Lilian Pratt Riccio do (IOC).

Resumidamente, placas de 96 poços (NuncMaxiSorp®) foram sensibilizadas com antígenos de *P. vivax* nas concentrações de 3 µg/mL para DBPII e 1,5 µg/mL para AMA-1 e EBP-2 por 12 horas a 4°C. Após a incubação, a placa foi lavada com solução de PBST por 3 vezes e bloqueadas com 200 µL/poço da solução de bloqueio (PBST com 5% de leite em pó desnatado). Após 1 hora, as placas foram lavadas 5 vezes com a solução de PBST e incubadas a 37°C com 100 µL de plasma diluído a 1:50 (IgM) ou 1:100 (IgG) em tampão PBST contendo 3% de leite em pó desnatado, em duplicata. Após a incubação, as placas foram lavadas novamente e incubadas por 1 hora com 100 µL/poço do conjugado anti-IgM de humano (1:5.000) e anti-IgG de macaco rhesus (A-2054; Sigma-Aldrich) ligado à peroxidase diluído 1:80000 em PBST com 3% de leite em pó desnatado. Após a lavagem, a reação foi revelada com dicloridrato de ortofenilenodiamina (OPD, Sigma-Aldrich) diluído em 50 mL de tampão 0,1 M citrato de sódio pH 5,0 e 40 µL de peróxido de hidrogênio a 30% (Merck Millipore). Após 20 minutos, a reação foi interrompida com 50 µL de solução 4N ácido sulfúrico. A densidade ótica foi mensurada em filtro de 492nm (DO492nm) em leitor automático de ELISA (Spectra Max 340 PC 384, Molecular Devices). Os valores foram expressos em índice de reatividade (IR) sendo considerados positivos animais com IR > 1. Os *cut-off* para os antígenos foram, PvEBP-2: 0,196 e 0,011; PvDBPII: 0,371 e 0,019; PvAMA-1: 0,138 e 0,034, para IgM e IgG respectivamente.

4.9 Processamento das amostras de sangue: obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Foram coletadas 57 amostras de sangue para separação dos PBMCs de PNHs do CEPESBI e CPRJ, como destacado nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. O sangue total coletado em tubo com heparina sódica foi diluído na proporção 1:1 em PBS/SFB 2% (Soro Fetal Bovino, Gibco). Cuidadosamente o sangue foi adicionado sobre uma solução de histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:2 e centrifugado a 350 x g por 40 min em temperatura ambiente. O anel formado entre a interface do plasma e histopaque (PBMCs) foi coletado e submetido a lavagens com RPMI incompleto (24 mM bicarbonato de sódio, 2 mM L-glutamina, 25 mM HEPES, 100 U/mL penicilina e 0,017 mM estreptomicina, pH 7,4, 350 x g por 10 min a 4°C, 3 vezes. As células foram ressuspensas, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração entre 5×10^5 a 1×10^7 células/mL em 90% de soro bovino fetal (SFB, Gibco) suplementado com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Inicialmente, a suspensão de PBMCs foi mantida em câmara de congelamento (Nalgene) contendo isopropanol em -80°C por 24h, seguida de armazenamento em nitrogênio líquido até o uso.

4.10 Descongelamento e imunofenotipagem de células T

O descongelamento das PBMCs dos PN foi feito delicadamente em banho-maria a 37°C, então as células foram adicionadas em tubos de polipropileno (Falcon) contendo 10 mL de RPMI completo (10% SBF, pH 7,4) contendo 20 g/mL de benzonase® nuclease (Sigma-Aldrich). Em seguida, as células foram lavadas com RPMI completo em 1400 rpm por 10 minutos, 4°C. Após a lavagem, 1mL de meio RPMI completo foi usado para ressuspender as células e então, 10 ul da suspensão foram diluídos em 90 ml do corante de viabilidade Tripán Blue (Gibco) para contagem usando o contador automático Countess C10281 Automated Cell Counter Hemocytometer (Invitrogen). Após a contagem a concentração de PBMCs viáveis foi ajustada para 1×10^6 células/mL, e então foram distribuídas em tubos de polipropileno de 5mL (Falcon).

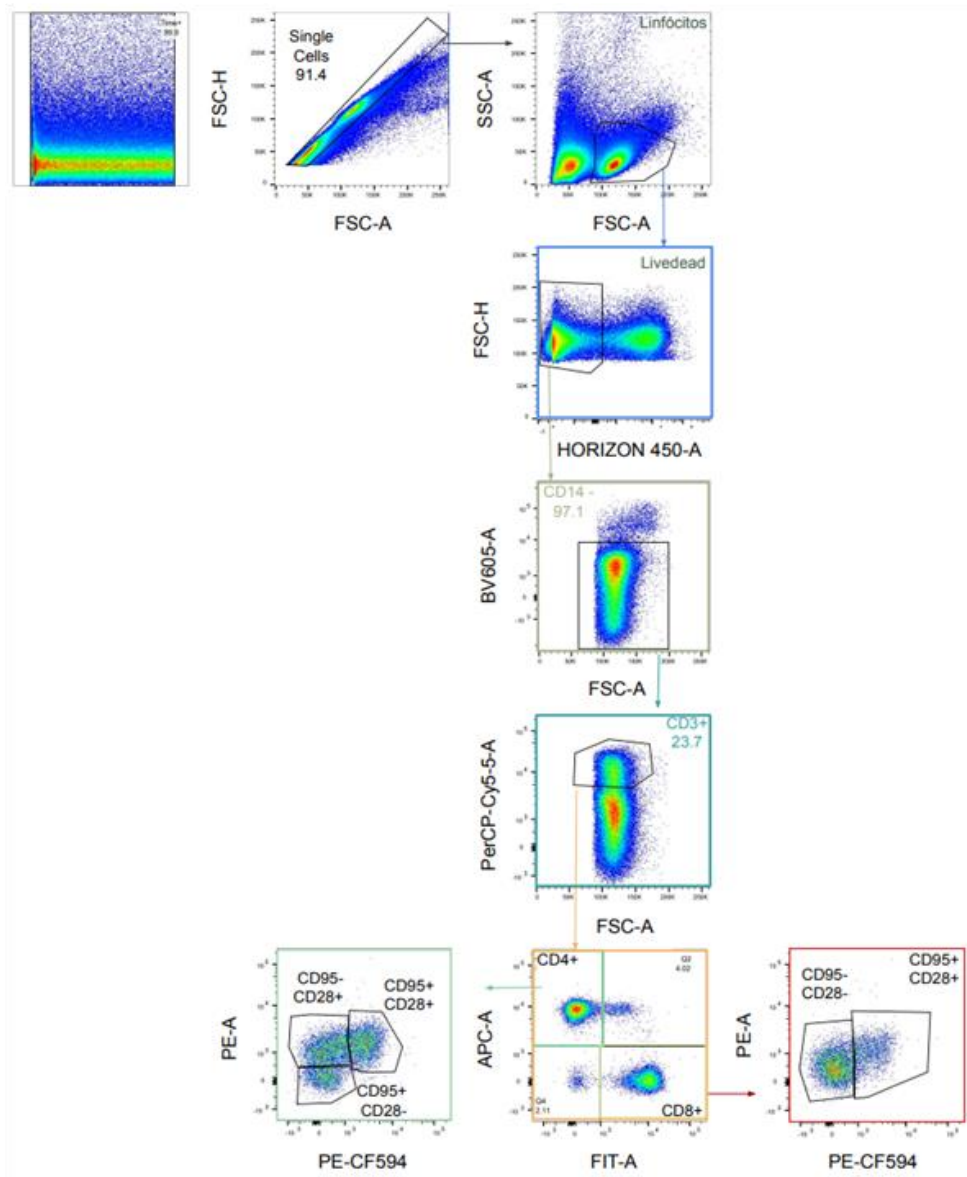
A seguir, PBS 1X foi usado para ressuspender as células, que foram incubadas com marcador de viabilidade celular (Live/Dead Fixable Dead Cell Stains, Invitrogen, Califórnia, USA) por 30 minutos. Posteriormente as células foram lavadas com PBS 1X e então foi realizada a marcação de superfície com um painel contendo anticorpos para avaliação de subpopulações de células T CD4 e CD8 (memória e efetora). Todos os anticorpos selecionados

foram previamente titulados baseado no ensaio de imunofenotipagem de sangue fresco padronizado pela Dra Cristiana Brito durante seu Pós-doc na Emory University, em *Aotus* infectado por *Plasmodium vivax* Brasil VII (dados não publicado) e o volume de cada anticorpo foi ajustado dentro do painel para avaliação das subpopulações de células T. No quadro 1 foram descritos os marcadores, clones e fluoróforos utilizados neste painel.

Em síntese, a diluição dos anticorpos foi feita em tampão de FACs (PBS 1X contendo 2% de SBF) e 100µL do mix de anticorpos foram adicionados a uma concentração de 1×10^6 células/mL de cada primata neotropical. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos sob proteção da luz a fim de realizar a marcação de superfície com os anticorpos. As células foram lavadas com tampão de FACs e centrifugadas a 1400 rpm por 10 minutos, 4°C e então ressuspendidas em tampão FACs. Para cada amostra foram adquiridos cerca de 200.000 eventos, a aquisição das células foi realizada usando o citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Pharmingen), onde os parâmetros de tamanho (FSC) e granulidade (SSC) foram utilizados para selecionar a população de linfócitos, em seguida, os dados foram analisados utilizando o programa FlowJo versão 10.

A fim de padronizar a caracterização das subpopulações de células T, foram utilizados os marcadores CD3, CD4, CD8, CD28, CD95. A estratégia de análise usada para segregação das subpopulações de células T foi baseada na exclusão inicial de células mortas (marcadas com corante Live/Dead) e em seguida, a exclusão de monócitos (CD14+), assim, essas populações foram agrupadas em um único canal de leitura no citômetro (comprimento de onda violeta 405nm, V450). Posteriormente as células T totais foram identificadas através da expressão do marcador CD3 +. A seguir, usando o conjunto de marcadores CD4 e CD8, as células T foram classificadas em subconjuntos de células T Helper (CD4+ CD8-), e células T Citotóxicas (CD8 + CD4-). A inclusão de CD28+ CD95+ possibilitou um maior refinamento desses subconjuntos, e ambas as células T CD4+ e CD8+ foram subdivididas e identificadas em: Células T Naïve (CD28+ CD95-), células T de memória central (CD28+CD95+) e células T de memória efetora (CD95+CD28-), baseado no protocolo de Pitcher e colaboradores (2002), desenvolvido em macacos Rhesus (PNH do velho mundo) (Figura 12).

Figura 12 - Estratégia de análise por citometria de fluxo para fenotipagem de subpopulações de células T.



Legenda: Estratégia de análise por citometria de fluxo para fenotipagem de subpopulações de células T. Subconjuntos de células mortas marcadas com corante de viabilidade celular Live/Dead e Monócitos (CD14⁺), foram agrupadas em um mesmo canal de exclusão. A partir do gate de células T totais (CD3⁺) foram obtidas as subpopulações de células T Helper (CD4⁺ CD8⁻), e células T Citotóxicas (CD8⁺ CD4⁻). A partir de ambas as células T Helper e T Citotóxicas as subpopulações de células T foram classificadas em: Células T Naïve (CD28⁺ CD95⁻), células T de memória central (CD28⁺ CD95⁺) e células T de memória efetora (CD95⁺ CD28⁻).

Quadro 1- Lista de anticorpos utilizados para o ensaio de citometria de fluxo

Marcador	Fluoróforo	Clone	Marca
LiveDead	V450	-	Thermo
CD8	FITC	LT8	Thermo
CD14	BV605	M5E2	Biologend
CD4	APC	L200*	BD biosciences
CD3	PerCP-Cy5.5	SP34-2	BD biosciences
CD95	PE-CF594	DX2*	BD biosciences
CD28	PE	L293*	BD biosciences

*Mesmo fluorocromo e clone utilizado por Pitcher *et al.*, 2002.

4.11 Análise dos dados

As análises estatísticas foram realizadas no programa Prism 8.0 (GraphPad software, Inc., San Diego, CA, EUA) e na plataforma R versão 4.0.2 (Vienna, Austria) (R core team, 2020). As distribuições dos parâmetros foram determinadas pelos testes Kolmogorov Smirnov e Shapiro-wilk. Diferenças nas proporções da soropositividade foram avaliadas por meio do teste de Fisher ou do qui-quadrado (X^2), de acordo com a distribuição dos dados. As diferenças entre as medianas e/ou médias dos index de reatividade (IR) de dois grupos foram verificadas por meio do teste t ou de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição dos dados. A comparação do IR entre mais de dois grupos foi feita pelo teste de Análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis, seguido de teste post hoc de Tukey ou Dunn, respectivamente, de acordo com a distribuição dos dados. A associação entre as variáveis categóricas (sexo, idade, vida livre / cativo e PCR+/ PCR-) foi avaliada pelo teste Qui-quadrato ou teste Fisher. Os *Heatmaps* foram criados utilizando o ComplexHeatmap (Gu; Elis; Schlesner, 2016). As interseções dos respondedores aos antígenos eritrocíticos de *Plasmodium vivax* e o antígeno PvCSP foram plotadas usando o pacote “UpSetR” R (v1.4.0) (Conway; Lex; Gehlenborg, 2017). As análises de correlação entre os níveis de anticorpos dos respondentes foram avaliadas com a correlação de classificação de Sperman. Para as análises das covariáveis associadas descritas acima, com as razões de chances (Odds Ratio) do animal apresentar anticorpos IgM/IgG contra os antígenos de *Plasmodium* sp., modelos lineares generalizados (modelo de regressão gama, regressão logística) e o modelo de mistura gama-binomial, foram utilizados. As covariáveis com valores de $P \leq 0,20$ no teste de razão de verossimilhança seguiram para a etapa 2, onde todas foram ajustadas conjuntamente. A partir desse momento, todas as covariáveis que passaram da etapa anterior são ajustadas juntas. A significância de cada um foi analisada separadamente por meio do teste de razão de verossimilhança. Aqui, comparamos se houve diferença significativa entre o modelo sem e com a covariável em questão. Um modelo foi ajustado com todos os significativos na etapa anterior. O processo foi repetido até que restassem apenas covariáveis significativas. Para os resultados do ensaio de citometria, os dados foram analisados usando os programas FlowJo 10. As diferenças entre as médias das frequências de células de dois grupos foram verificadas por meio do teste t ou de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição dos dados.

5. RESULTADOS

5.1 Artigo 1



OPEN ACCESS

Edited by:

Robert William Moon,
London School of Hygiene and
Tropical Medicine, United Kingdom

Reviewed by:

Che Julius Ngwa,
RWTH Aachen University, Germany
Thais De Oliveira,
University of São Paulo, Brazil

***Correspondence:**

Cristiana Ferreira Alves de Brito
cristiana.brito@fiocruz.br

***Present address:**

Juan Camilo Sánchez-Arcila,
Molecular and Cell Biology
Department, School of Natural
Sciences, University of California,
Merced, CA, United States

Specialty section:

This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 10 March 2021

Accepted: 22 April 2021

Published: 13 May 2021

Citation:

Assis GMPd, Alvarenga DAMd,
Costa Pereira MoO,
Sánchez-Arcila JC,
de Pina Costa A, Souza Junior JCd,
Nunes AJD, Pissinatti A, Moreira SB,
de Menezes Torres L,
Costa HL, da Penha Tinoco H,
Pereira VdS, Soares IdS, Sousa TNd,
Ntumngia FB, Adams JH, Kano FS,
Hirano ZMB, Daniel-Ribeiro CT,
Oliveira Ferreira J, Carvalho LH and
Alves de Brito CF (2021) Profiling
Humoral Immune Response Against
Pre-Erythrocytic and Erythrocytic
Antigens of Malaria Parasites
Among Neotropical Primates
in the Brazilian Atlantic Forest.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:678996.
doi: 10.3389/fcimb.2021.678996

Profiling Humoral Immune Response Against Pre-Erythrocytic and Erythrocytic Antigens of Malaria Parasites Among Neotropical Primates in the Brazilian Atlantic Forest

Gabriela Maira Pereira de Assis¹, Denise Anete Madureira de Alvarenga¹,
Matheus de Oliveira Costa Pereira¹, Juan Camilo Sánchez-Arcila^{2†}, Anielle de Pina Costa^{3,4,5},
Júlio César de Souza Junior^{6,7}, Ana Julia Dutra Nunes^{6,8}, Alcides Pissinatti^{5,9},
Sílvia Bahadian Moreira⁹, Leticia de Menezes Torres¹, Helena Lott Costa¹,
Herlandes da Penha Tinoco¹⁰, Valéria do Socorro Pereira¹⁰, Irene da Silva Soares¹¹,
Taís Nóbrega de Sousa¹, Francis Babila Ntumngia¹², John H. Adams¹², Flora Satiko Kano¹,
Zelinda Maria Braga Hirano^{6,7}, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro^{3,13}, Joseli Oliveira Ferreira²,
Luzia Helena Carvalho¹ and Cristiana Ferreira Alves de Brito^{1*}

¹ Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular e Imunologia da malária, Instituto René Rachou/Fiocruz Minas, Belo Horizonte, Brazil; ² Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil; ³ Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária (CPD-Mal), Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil; ⁴ Ambulatório de Doenças febris, Instituto Nacional de Infectologia (INI), Ambulatório de Doenças Febris Agudas, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil; ⁵ Centro Universitário Serra dos Órgãos (UNIFESO), Teresópolis, Brazil; ⁶ Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial, Indaial, Brazil; ⁷ Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau, Brazil; ⁸ Programa de conservação do Bugio Ruivo, Joinville, Brazil; ⁹ Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), Instituto Estadual do Ambiente (INEA), Guapimirim, Brazil; ¹⁰ Fundação de Parques Municipais e Zootécnica (FFMZB), Belo Horizonte, Brazil; ¹¹ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; ¹² Center for Global Health and Infectious Diseases Research, College of Public Health, University of South Florida, Tampa, FL, United States; ¹³ Laboratório de Pesquisa em Malária, IOC/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

Human malaria due to zoonotic transmission has been recorded in the Atlantic Forest, an extra-Amazonian area in Brazil, which are a challenge for malaria control. Naturally acquired humoral immune response against pre-erythrocytic and erythrocytic antigens of Neotropical primates (NP) was evaluated here to improve the knowledge about the exposure of those animals to the malaria transmission and support the identification of the potential reservoirs of the disease in the Atlantic Forest. Blood samples of 154 monkeys from three areas of the Atlantic Forest were used to identify IgG antibodies against peptides of the repeat region of the major pre-erythrocytic antigen, the circumsporozoite protein (CSP), of *Plasmodium vivax* (PvCSP), *Plasmodium brasilianum/Plasmodium malariae* (Pb/PmCSP), and *Plasmodium falciparum* (PfCSP) by ELISA. Antibodies against erythrocytic recombinant antigens of *P. vivax*, Apical membrane antigen 1 (PvAMA-1), Erythrocyte binding protein 2 (PvEBP-2) and domain II of Duffy binding protein (PvDBPII) were also evaluated. Parameters, such as age, sex, PCR positivity,

and captivity, potentially associated with humoral immune response were analyzed. Eighty-five percent of NP had antibodies against at least one CSP peptide, and 76% against at least one *P. vivax* erythrocytic antigen. A high percentage of adults compared to non-adults were seropositive and showed increased antibody levels. Neotropical primates with PCR positive for *P. simium* had a significantly higher frequency of positivity rate for immune response against PvEBP-2, PvDBP11 and also higher antibody levels against PvDBP11, compared to PCR negative NPs for this species. Monkeys with PCR positive for *P. brasilianum/P. malariae* showed higher frequency of seropositivity and antibody levels against Pb/PmCSP. Levels of antibodies against Pb/PmCSP, PvEBP-2 and PvDBP11 were higher in free-living than in captive monkeys from the same area. All Platyrrhine families showed antibodies against CSP peptides, however not all showed IgG against erythrocytic antigens. These findings showed a high prevalence of naturally acquired antibodies against CSP repeats in all studied areas, suggesting an intense exposure to infected-mosquitoes bites of NP from all families. However, mainly monkeys of Atelidae family showed antibodies against *P. vivax* erythrocytic antigens, suggesting blood infection, which might serve as potential reservoirs of malaria in the Atlantic Forest.

Keywords: malaria, humoral response, neotropical primates, Atlantic forest, pre-erythrocytic antigen, erythrocytic antigens

INTRODUCTION

Malaria remains an important public health problem despite of many efforts to control the disease around the World. According to the latest estimates of the World Health Organization, there were about 229 million human malaria cases and 409 000 deaths in 2019 (World Health Organization, 2020). Five *Plasmodium* species are more frequently associated with human infection, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi*. The last species was recently described in a generalized zoonotic transmission in Southeast Asia (Cox-Singh, 2012). In Brazil, more than 150 000 cases of malaria were registered in 2019 (World Health Organization, 2020). Malaria is endemic almost exclusively within the Brazilian Amazon region, caused mainly by *P. vivax* (89%), followed by *P. falciparum* (11%) and with few notified cases of *P. malariae* (< 1%) (Ministerio da Saude, 2020). Nevertheless, 732 malaria cases were registered in 2018 in the extra-Amazon Region, including the Atlantic Forest region. Most of the cases in this region were diagnosed as *P. vivax* (de Pina-Costa et al., 2014). Recently, Brasil et al. reported that cases from an outbreak in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro state, initially diagnosed as *P. vivax* infection, were in fact caused by *Plasmodium simium*, a neotropical primate (NP) parasite (Brasil et al., 2017).

Abbreviations: CEPESBI, Centre for Biological Research of Indaial; CPRJ, Primate Centre of Rio de Janeiro; CSP, Circumsporozoite protein; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; NP, Neotropical primates; OD, Optical density; Pb/PmCSP, Circumsporozoite protein repeats of *P. brasilianum/P. malariae*; PCR, Polymerase Chain Reaction; PfCSP, Circumsporozoite protein repeats of *P. falciparum*; PvAMA-1, *P. vivax* Apical Membrane antigen - 1; PvCSP, Circumsporozoite protein repeats of *P. vivax*; PvDBP11, *P. vivax* Duffy Binding Protein region II, PvEBP-2: *P. vivax* Erythrocyte Binding Protein 2; RI, Reactivity index; SD, Standard deviation.

In the Brazilian forests, there are two malaria parasites primarily infecting primates: *Plasmodium brasilianum* and *Plasmodium simium*. *P. simium* infects primates of the Atlantic Forest from South and Southeastern Brazil of Atelidae, Cebidae and Pitheciidae families (da Fonseca, 1951; Deane, 1992; de Alvarenga et al., 2015). *Alouatta guariba clamitans* (southern brown howler monkeys) is the species most frequently infected by *P. simium* (Deane, 1992; de Alvarenga et al., 2015; Abreu et al., 2019). *P. brasilianum* infects primates of all neotropical primate families distributed from Central America to the South of Brazil (Seidelin, 1912; Deane, 1992; Lourenço-de-Oliveira and Deane, 1995; Lalremruata et al., 2015; Alvarenga et al., 2017). Of importance, *P. simium* and *P. brasilianum* are morphological, genetic, and immunologically similar to human *Plasmodium* species, *P. vivax* and *P. malariae*, respectively (Coatney, 1971; Seed, 1976; Cochrane et al., 1985; Barnwell, 1986; de Arruda et al., 1989; Deane, 1992; Goldman et al., 1993; Escalante et al., 1995; Escalante et al., 1998; Fandeur et al., 2000; Volney et al., 2002; Tazi and Ayala, 2011; de Alvarenga et al., 2015; Lalremruata et al., 2015; Brasil et al., 2017). Brasil et al. and Lalremruata et al. molecularly characterized *P. simium* and *P. brasilianum* infections in humans and NPs, indicating their zoonotic transmission and reinforcing that non-human primates may act as malaria reservoirs (Lalremruata et al., 2015; Brasil et al., 2017). Mourier et al. showed the close similarity of whole genomes of *P. simium* from human and monkeys, and comparing the genes involved in the erythrocyte invasion identified a possible adaptation of the parasite for human and monkey infections in the Brazilian Atlantic Forest and reinforce the hypothesis of zoonotic transmission of *P. simium/P. vivax* (Mourier et al., 2019). In this context, zoonotic malaria constitutes a major challenge for malaria elimination.

Considering the genetic proximity between *P. simium* and *P. vivax*, and between *P. brasilianum* and *P. malariae*, the study of these species contributes to understanding their evolution in the America region. However, there are only a few studies of monkeys naturally infected by *P. simium* and *P. brasilianum* and even a smaller number of studies of the immune response in these animals (Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011; Costa et al., 2014; Monteiro et al., 2020). Thus, the identification of species from different families of NPs will enable a better understanding of these species as potential malaria reservoirs and whether these *Plasmodium* species in their natural hosts showed a similar immune response compared to human malaria.

The present study comprises an unprecedented study of malaria antibodies, using both *Plasmodium* pre-erythrocytic and different erythrocytic stage antigens in NP from distinct areas of the Brazilian Atlantic Forest.

MATERIALS AND METHODS

Characteristics of Studied Areas and Non-Human Primate Blood Samples

Samples were obtained from 154 NPs belonging to all families from three areas (Indaial/SC, Joinville/SC, and Guapimirim/RJ) of the Atlantic forest from South and Southeastern Brazil (Supplementary Table 1). Our group studied these areas and showed a distinct epidemiologic profile for malaria in NPs (Costa et al., 2014; de Alvarenga et al., 2018; Nunes et al., 2020). Blood was drawn from the femoral or brachial vein using tubes with anticoagulant (5% EDTA). After the collection, blood samples were centrifuged at 1500 \times g for 10 min at room temperature and plasma stored at -20°C. Information about sex and age group from each animal were collected (Table 1). The age, estimated as proposed by Carpenter, was used to categorize the animals as non-adults (juveniles) and adults (including also subadults) (Carpenter, 1965).

The first study area was in the municipality of Indaial (26° 53'52" S/49°13'54" W) located in Santa Catarina state, South

Brazil. In this municipality is located the Centre for Biological Research of Indaial (CEPESBI) (IBAMA register number 1/42/98/000708-90), a conservation unit for southern brown howler monkey located in the Valley of Itajaí in the Atlantic Forest (Figure 1). Samples from 63 captive *Alouatta guariba clamitans* were collected between 2008 and 2019. Samples from 12 free-living NP captured in the Geisler Mountain in Indaial or attended in the veterinary hospital of University Regional of Blumenau (FURB), from different areas of Santa Catarina state were also collected (Supplementary Table 1). Eighty-one percent of animals were adults (Table 1). *Plasmodium* infection was previously identified by our group in 13% of animals by polymerase chain reaction (PCR) (Snounou et al., 1993; Costa et al., 2014; de Alvarenga et al., 2018).

The second area was in the city of Joinville, located also in Santa Catarina state, South Brazil (26°14'41.78" S/48°53'02.78" W), in an Atlantic forest conservation area located on a private property (Figure 1). Samples of 39 free-living howler monkeys were collected from July to December in 2015 and 2017 (for more details about capture see Ref. Nunes et al., 2020). The capture has prioritized adults, resulting in 85% of the monkeys (Table 1). *Plasmodium* infection was previously identified in 67% of studied animals that were infected with *P. simium* and/or *P. brasilianum* by PCR (Nunes et al., 2020).

The third area was in the municipality of Guapimirim, located in Rio de Janeiro state, Southeast Brazil (22°29'18.28" S/42°54'48.43" W) (Figure 1). This municipality is home to the Primate Centre of Rio de Janeiro (CPRJ), a conservation unit for wild monkeys on the Serra dos Órgãos, in the Atlantic Forest, about 100 km from the city of Rio de Janeiro. Samples from 40 captive adult monkeys belonging to all Platyrrhini families were collected from January 2011 to October 2019 (Table 1). *Plasmodium* infection was previously identified in 32% of animals by PCR (de Alvarenga et al., 2015; Alvarenga et al., 2017).

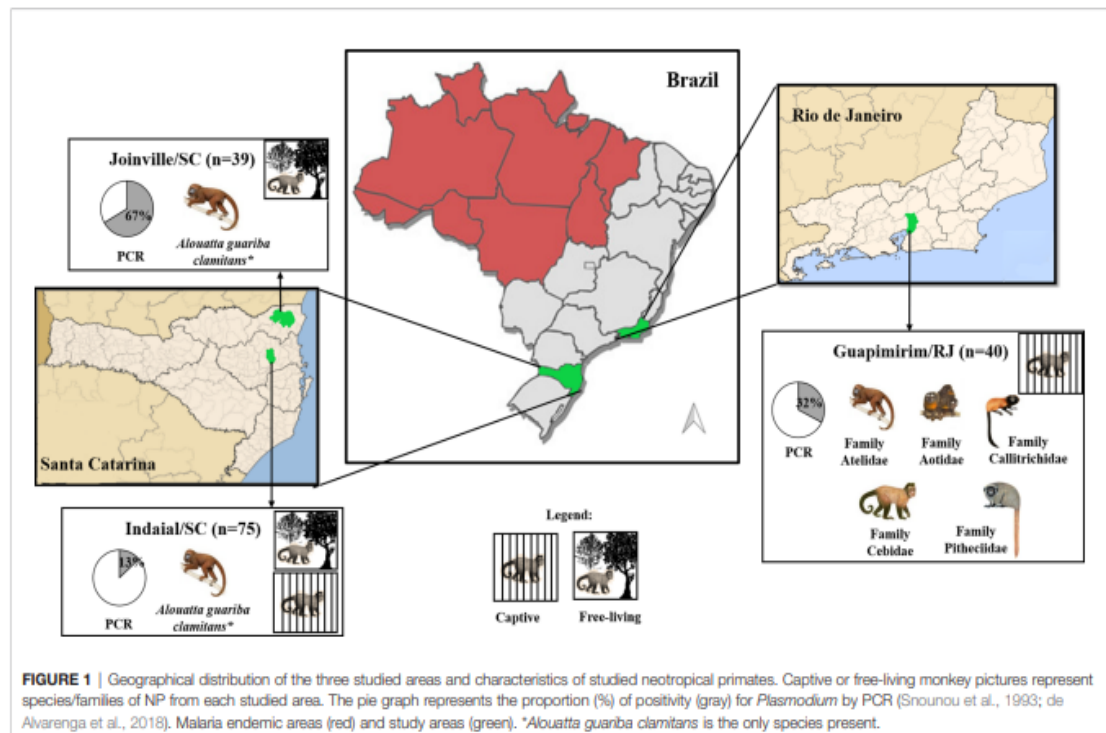
Ethics Statement

Capture and biological samples collection were performed according to the Brazilian guidelines and regulations and were

TABLE 1 | Characteristics of monkeys from each studied area.

Characteristic	Studied area (Municipality/State)			Total
	Indaial/SC	Joinville/SC	Guapimirim/RJ	
	N = 75	N = 39	N = 40	N = 154
Sex ratio male:female	1.27:1	0.95:1	1:1.22	1.05:1
Ratio Adult: Non-adult ^a	4.35:1	5.5:1	40:0	6.7:1
Ratio Captive: Free-living	5.25:1	0:39	40:0	2.01:1
Families				
Atelidae	75 (100%) ^b	39 (100%) ^b	8 (20%) ^c	122 (79.2%)
Aotidae	0	0	1 (2.5%) ^d	1 (0.6%)
Callitrichidae	0	0	4 (10%) ^e	4 (2.6%)
Cebidae	0	0	24 (60%) ^f	24 (15.6%)
Pitheciidae	0	0	3 (7.5%) ^g	3 (1.9%)
Positivity by PCR^h	10 (13%)	26 (67%)	13 (32%)	59 (32%)

Results are expressed in absolute numbers and percentages in parentheses. ^aAge was estimated according to Carpenter, 1965. Studied species: ^b*Alouatta g. clamitans*, ^c*Alouatta g. clamitans*, *Alouatta caraya*, *Ateles paniscus*, *Brachyteles arachnoides*; ^d*Aotus nigriceps*; ^e*Mico humeralifer*, *Leontopithecus chrysomelas*, *Leontopithecus rosalia*, *Saguinus midas*; ^f*Cebus sp.*, *Sapajus robustus*, *Sapajus xanthosternus*; ^g*Cacajao melanocephalus*, *Calliobus personatus*. ^hMolecular diagnosis of *Plasmodium* sp. infection was previously performed by our group (Costa et al., 2014; de Alvarenga et al., 2015; Alvarenga et al., 2017; de Alvarenga et al., 2018; Nunes et al., 2020) according to Snounou et al. (1993).



approved by the Fiocruz Research Ethical Committee (CEUA license L037/2016) and by the Brazilian Ministry of Environment (SISBIO numbers 43375-4, 43375-6, 54707-137362-2, 52472-1, 28953-1).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Pre-Erythrocyte Antigen

Synthetic peptides representing the repeated immunodominant epitope of the major pre-erythrocytic antigen, the circumsporozoite protein (CSP), were used for the detection of immunoglobulin G (IgG) antibodies. All three variant sequences of *P. vivax* (PvCSP) were used: *P. vivax* "classic" VK210 (Pvc) DGQPAGDRAAGQPAG-(DRADGQPAG)₂; *P. vivax* VK247 (Pvk) (ANGAGNQPG)₃-ANGAGN; and *P. vivax*-like (Pvl) (APGANQEGGAA)₃. CSP peptides from *P. falciparum* (NANP)₈ and *P. malariae*/*P. brasilianum* (GNAA)₂-GNDA (GNAA)₄ were also used. *P. brasilianum* and *P. malariae* share identical CSP repeat sequences, it was named here Pb/PmCSP (Guimarães et al., 2012; Pereira et al., 2018).

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the CSP was performed, as previously described (Duarte et al., 2006; Pereira et al., 2018), with modifications. Briefly, MaxiSorp™ plates (Nunc, Carlsbad, CA, USA) were coated with 10 µg/mL of the CSP synthetic peptides diluted in PBS (Phosphate Buffer Solution), and incubated for 12–16 hours at 4°C. Individual plasma samples were incubated at 1:50 dilution in PBST (PBS + 0.05% Tween 20) plus 2.5% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), for

one hour at 37°C. Antibodies were detected by anti-*Macaca mulatta* IgG-peroxidase conjugated (Sigma-Aldrich) at 1:3000 dilution in PBST plus 2.5% BSA, and incubated one hour at 37°C. In each well was added 50 µL of the solution with 20 µg O-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, USA) diluted in 50 mL of sodium citrate buffer (0.1 M pH 5.0) in the presence of 40 µL hydrogen peroxide and left in dark for 20 min at 37°C. Reaction development was interrupted by adding 25 µL of 2 M H₂SO₄ in each well. The optical densities (ODs) were evaluated on an ELISA reader (Spectra Max 340PC 384, Molecular Devices) at 490 nm. Results were expressed as reactivity index (RI), which was calculated by dividing the mean of OD values of tested samples by the mean plus three standard deviations (SDs) of negative control samples (sera of three *Alouatta g. clamitans* from Fundação de Parques Municipais e Zoológica em Belo Horizonte in Minas Gerais state, Brazil, a non-transmission malaria area). This species was chosen because it represents 77% of the studied animals herein. Samples with a RI greater than 1 were considered positive. For comparisons with immune response against erythrocytic antigens, samples were considered positive for PvCSP when they showed RI >1 for any of three CSP repeats (VK210, VK247 or *P. vivax*-like).

P. vivax Erythrocytic Antigens

Conventional enzyme-linked immunoassays (ELISA) for total IgG antibodies against *P. vivax* recombinant proteins, domain II of Duffy binding protein (PvDBPII) from Sal-1 strain, Apical

membrane antigen 1 (PvAMA-1) and Erythrocyte binding protein 2 (PvEBP-2) were carried out as previously described (Cerávolo et al., 2005; Kano et al., 2012; Pires et al., 2018) with modifications. Our research group has been working for years on the production of recombinant proteins for the study of the human immune response against *P. vivax* antigens in endemic areas for malaria. Therefore, we chose to use only *P. vivax* erythrocytic antigens due to their availability in our laboratory, considering the homology between *P. vivax* and *P. simium* and the high prevalence of *P. simium* in the Atlantic Forest. Recombinant proteins were used at a final concentration of either 1.5 µg/mL (PvEBP-2 and PvAMA-1) or 3 µg/mL (PvDBP-II). Serum samples were used at 1:100 dilution, and peroxidase-conjugated anti-IgG of *Macaca mulatta* was used as secondary antibody at 1:80 000 dilution (Sigma-Aldrich) in PBST plus 3% skimmed milk powder, and incubated for one hour at 37°C. For each protein, the results were expressed as ELISA reactivity index (RI), values of RI > 1.0 were considered positive.

Statistical Analysis

Analyses were done using GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and R version 4.0.2 (Vienna, Austria) (R Core Team, 2020). The distribution of parameters was determined by the Kolmogorov Smirnov and Shapiro-Wilk tests. The differences between medians or means of two groups were verified using the T-test or the Mann-Whitney test, according to the data distribution. The comparisons between more than two groups were performed using the Analysis of Variance (ANOVA) or Kruskal-Wallis test, followed by Tukey or Dunn's *post hoc* test, according to the data distribution. The association between categorical variables was assessed using the Chi-square test (χ^2) or Fisher test. Heatmaps for antibody levels against *Plasmodium* antigens were created with ComplexHeatmap (Gu et al., 2016). The intersections of responders to PvCSP and *Plasmodium vivax* erythrocytic antigens were plotted using the "UpSetR" R package (v1.4.0) (Conway et al., 2017). Analyses of correlation between antibody levels of responders were assessed with Spearman's rank correlation. In all analyzes, a significance level of 5% was considered, i.e., values of $P < 0.05$.

RESULTS

Naturally Acquired Antibody Responses Against CSP Peptides

Overall, 85% (131/154) of NP showed IgG response against at least one of the five CSP peptides (Pvc: *P. vivax* VK210; Pvk: *P. vivax* VK247; Pvl: *P. vivax*-like, *P. brasilianum/P. malariae* and *P. falciparum*). The highest frequency of positive animals for any CSP peptide was identified in Joinville/SC (100%), followed by Guapimirim/RJ (90%) and Indaial/SC (75%) (Figure 2A top). The frequency of positive NP was significantly higher against Pb/PmCSP and PfcCSP only in Joinville/SC ($P < 0.05$, Chi-square test).

The levels of antibodies were low and similar among all peptides in Indaial/SC and Guapimirim/RJ. In Joinville/SC,

antibody levels were significantly highest against Pb/PmCSP (RI median = 10.78) than against other CSP peptides ($P < 0.01$, Kruskal-Wallis test) (Figure 2A bottom).

Naturally Acquired Antibody Responses Against *Plasmodium vivax* Erythrocytic Antigens

Significant levels of IgG against at least one of the three erythrocytic antigens were identified in 76% (119/154) of studied NP. The seroprevalence for any erythrocytic antigen was highest for Joinville/SC animals (100%), followed by Indaial/SC (90%) and Guapimirim (32%), and similar among antigens in each studied area (Figure 2B top).

Antibody titers against PvEBP-2 were higher than PvAMA-1 and PvDBP-II in Indaial/SC (RI median: PvEBP-2 = 19.65, PvAMA-1 = 7.98, and PvDBP-II = 5.58, $P < 0.0001$, Kruskal-Wallis test) and in Joinville/SC (RI median: PvEBP-2 = 20.08, PvAMA-1 = 8.91, and PvDBP-II = 7.59, $P < 0.0001$, Kruskal-Wallis test) (Figure 2B bottom).

Factors Potentially Associated With Seropositivity and Antibody Levels Against CSP and *P. vivax* Erythrocytic Antigens

Free-living monkeys showed a higher IgG response against Pb/PmCSP, PvEBP-2 and PvDBP-II when compared to the captive monkeys ($P < 0.05$, Mann-Whitney test) (Figure 3). The frequency of positivity in free-living monkeys was also higher for PvDBP-II. The comparison was possible only in Indaial/SC because only in this area captive and free-living monkeys were under similar transmission pattern.

Adult NPs had a higher IgG positivity rate than non-adults against CSP peptides from the three *Plasmodium* species (Pv, Pb/Pm and Pf) and higher levels of antibodies against PvEBP-2 (RI median = 20.24 and 15.69, respectively; $P = 0.0087$, Mann-Whitney test) and PvDBP-II (RI median = 7.727 and 4.454, respectively; $P = 0.0253$, Mann-Whitney test) (Figure 4). Seroprevalences and antibody titers were similar between sexes for CSP peptides and erythrocytic antigens ($P > 0.05$, Fisher test and Mann-Whitney test) (Supplementary Figure 1).

Among NPs with PCR positive for *P. brasilianum/P. malariae* (Pb/PmPCR+), frequency of responders and levels of antibodies against Pb/PmCSP were higher than in negative monkeys for this *Plasmodium* species (Pb/PmPCR-) (seroprevalences: 100% and 68%, respectively, $P = 0.0003$, Fisher test; antibody levels: RI median = 6.76 and 2.75, respectively, $P = 0.0002$, Mann-Whitney test) (Figure 5A). Frequencies of seropositivity against PvEBP-2 and PvDBP-II were higher in NPs with PCR positive for *P. simium* (PsPCR+) as compared to NPs with PCR negative for *P. simium* (PsPCR-) (Figure 5B). PsPCR+ monkeys also showed higher levels of antibodies against PvDBP-II than PsPCR- (RI median = 7.71 and 5.34, respectively; $P = 0.0479$, Mann-Whitney test). Comparing antibody response in PCR+ for any species of *Plasmodium* and PCR- monkey groups, the positivity rate to Pb/PmCSP and antibody levels against PvDBP-II and PvEBP-2 were higher in PCR+ monkeys (Supplementary Figure 2).

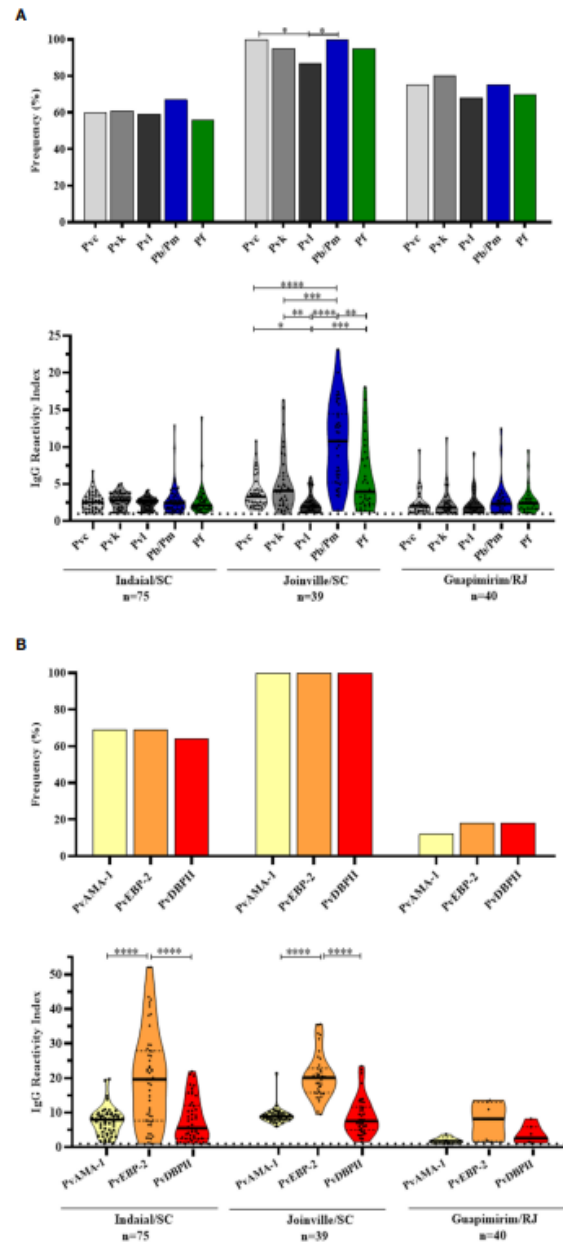
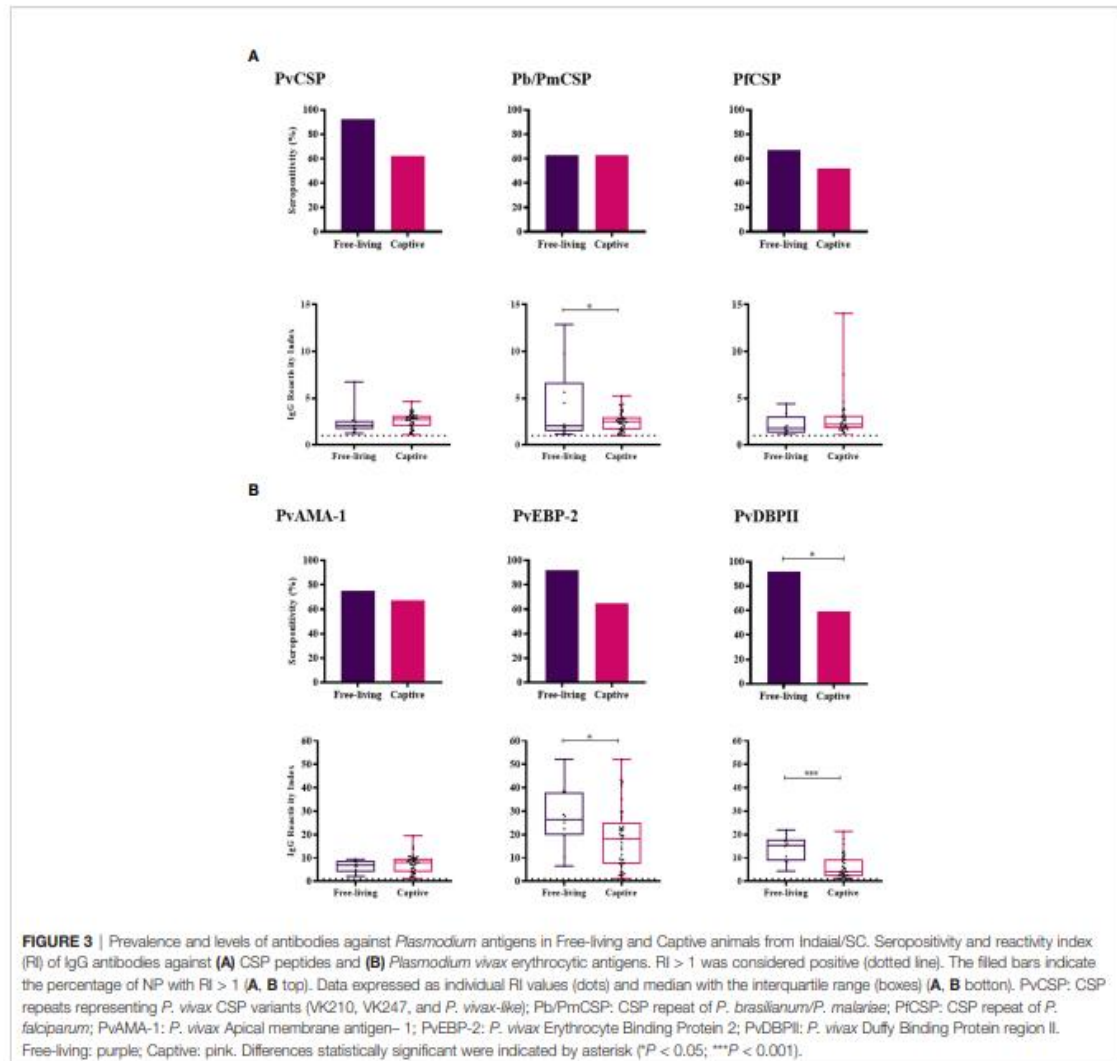


FIGURE 2 | Prevalence and levels of antibodies against *Plasmodium* antigens in neotropical primates. Frequency and reactivity index (RI) of IgG antibodies against **(A)** CSP peptides and **(B)** *Plasmodium vivax* erythrocytic antigens among NP from Indaial/SC, Joinville/SC, and Guapimirim/RJ. RI > 1 was considered positive (dotted line). The filled bars indicate the percentage of NP with RI > 1 (**A, B** top). Data expressed as individual RI values (dots) and median with the interquartile range (boxes) (**A, B** bottom). Pvc: *P. vivax* CSP VK210 (light gray); Pvk: *P. vivax* CSP VK247 (gray); Pvl: CSP *P. vivax*-like (dark gray); Pvl/Pm: *P. brasilianum*/*P. malariae* (blue); Pt: *P. falciparum* (green); PvAMA-1: *P. vivax* Apical membrane antigen – 1 (yellow); PvEBP-2: *P. vivax* Erythrocyte Binding Protein 2 (orange); PvDBPII: *P. vivax* Duffy Binding Protein region II (red). In the bottom of each graph is shown the numbers (n) of NP included in each area. Differences statistically significant were indicated by asterisk (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).



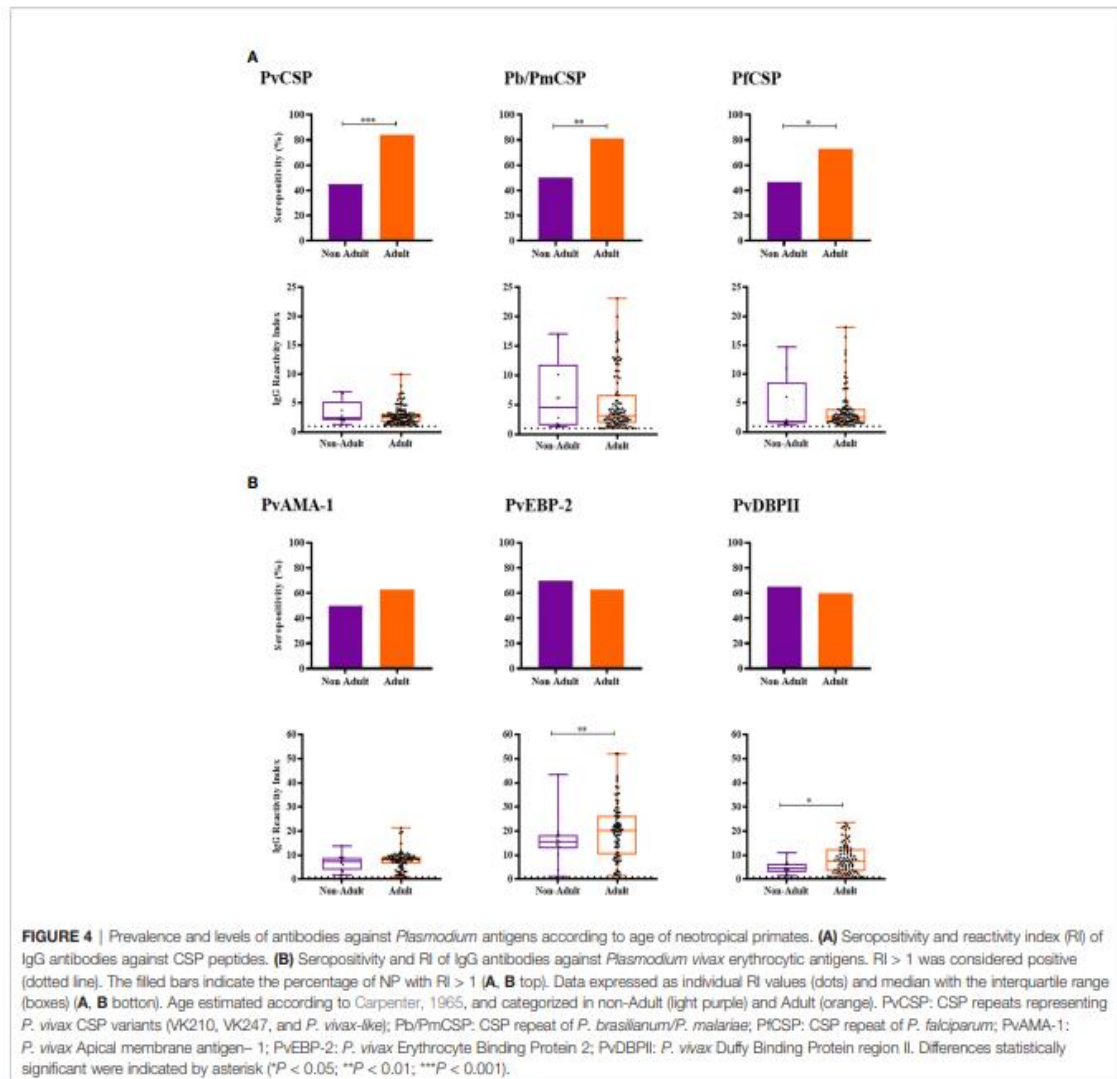
Naturally Acquired Antibody Responses Against *Plasmodium* spp. Antigens Among Neotropical Primate Families

All animals from Atelidae family showed antibodies against at least one of the three CSP peptides (Pv, Pb/Pm and Pf) and half of them also showed antibodies against erythrocytic antigens (Figure 6). Most animals in this family had medium to high levels of antibodies. A unique specimen of Aotidae family showed low/medium levels of IgG antibodies against the three CSP peptides but does not show antibodies against any erythrocytic antigens of *P. vivax*. In Callitrichidae family, half of the animals had low to high levels of antibodies against all three CSP peptides and two animals showed low levels of antibodies against only one erythrocytic antigen (Figure 6). Ninety-two percent of animals from Cebidae family showed

antibodies against at least one CSP peptide. However, only 17% of NP from this family showed antibodies against any erythrocytic antigen, mostly in lower levels. All specimens of Pitheciidae family showed antibodies against, at least, one CSP peptide and one erythrocytic antigen, generally in high levels (Figure 6). All these analyzes were performed with animals from Guapimirim/RJ because the other areas had species only from Atelidae family (Table 1).

Association Between the Immune Response Against PvCSP and Against Erythrocytic Antigens of *Plasmodium vivax*

Ninety-three of responder NPs showed antibodies against PvCSP and any erythrocytic antigen and 67 of responder NPs showed antibodies against all studied antigens (pre-erythrocytic and

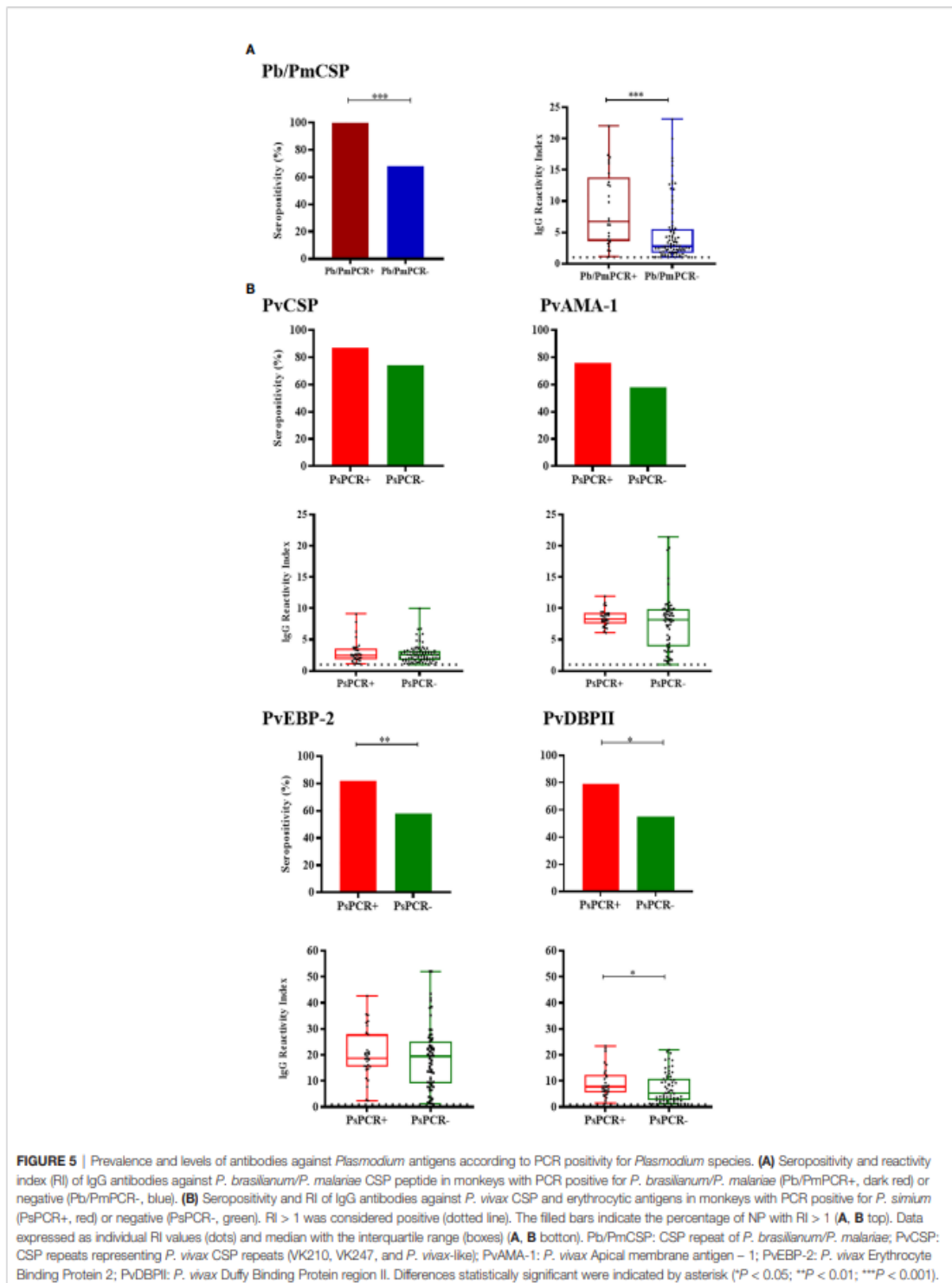


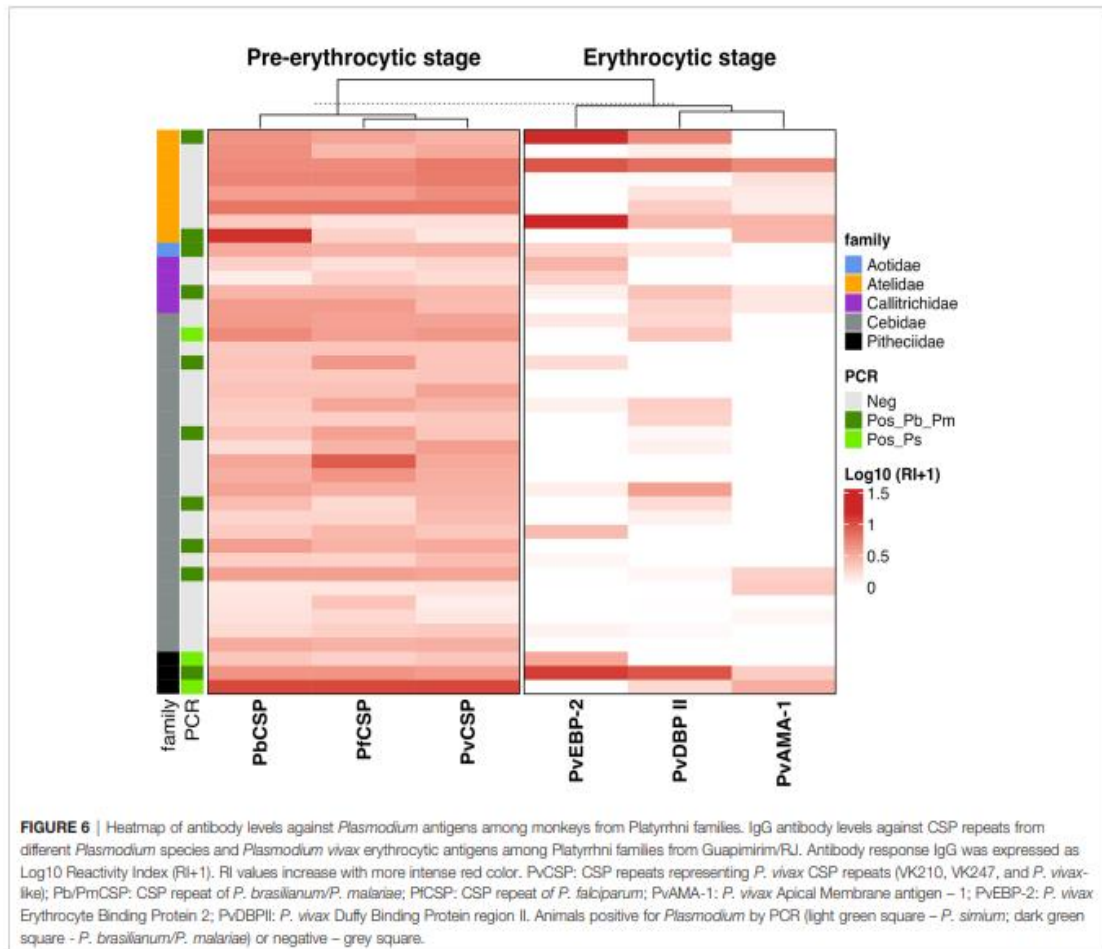
erythrocytic) (**Figure 7A**). Significant positive correlations ($P < 0.0001$, Spearman's test) were identified between antibody levels against PvCSP and PvAMA-1 ($r = 0.41$), PvAMA-1 and PvEBP-2 ($r = 0.38$), PvAMA-1 and PvDBPII ($r = 0.53$), and PvEBP-2 and PvDBPII ($r = 0.54$) (**Figure 7B**). This comparison was also performed grouping animals in PCR+ and PCR-, the only significant difference among PCR+ animals was the correlation between immune response against DBPII and EBP-2 ($r = 0.44$) (data not shown).

DISCUSSION

Neotropical primates infected with *P. simium* and *P. brasilianum* in the Brazilian Atlantic Forest have been largely reported

(Deane, 1992; Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011; Costa et al., 2014; de Alvarenga et al., 2015; Alvarenga et al., 2017; Monteiro et al., 2020; Nunes et al., 2020). However, the humoral immune response of NPs naturally exposed to *Plasmodium* spp. transmission in this biome is still poorly understood. This is the first study that evaluates the humoral response of neotropical primates from different areas of the Atlantic forest against pre-erythrocytic and erythrocytic antigens of malaria parasites. The detection of antibodies against CSP peptides, the major pre-erythrocytic antigen covering the entire sporozoite surface, was evaluated to access the immune responses of NPs exposure to infected mosquito bites. Additionally, the presence of IgG against erythrocytic *P. vivax* antigens was evaluated to identify immune response in potentially well-established *Plasmodium* blood infection.

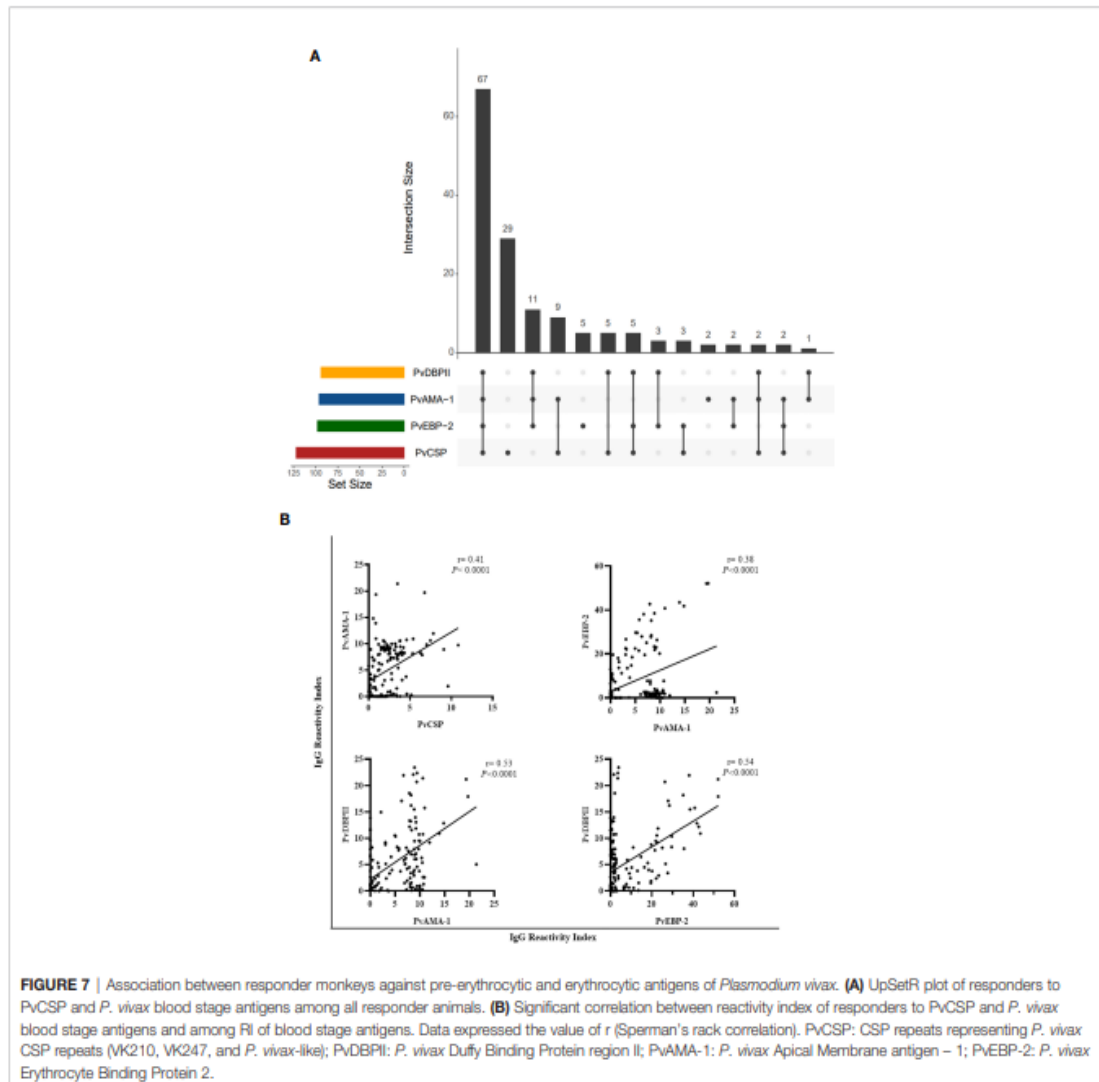




In the three studied areas, most neotropical primates had antibodies against *P. vivax* CSP variants, in slightly higher frequency against *P. vivax* VK210 and VK247. These CSP variants were the most frequent for *P. vivax* and the only ones described for *P. simium* (Goldman et al., 1993; Oliveira-Ferreira et al., 2004; Santos et al., 2019). Herein, NPs also showed antibodies against *P. brasilianum/P. malariae* CSP, as previously reported for NPs from Atlantic Forest in the São Paulo state (Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011). High seroprevalence against *P. falciparum* CSP was observed here, in concordance to previous reports of NP from other states (Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011). Although, all our NP samples were negative for *P. falciparum* infection, and only few descriptions of *P. falciparum* infected humans and mosquitoes have been described in the Atlantic forest area (Cerutti et al., 2007; Maselli et al., 2014; Laporta et al., 2015). The occurrence of a certain cross-reactivity degree among CSP repeats from different *Plasmodium* species, and also among *P. falciparum* CSP and asparagine-rich proteins from asexual parasite stage of other *Plasmodium* species in humans as well as non-human

primates has been reported (Hope et al., 1984; Cochrane et al., 1990; Cochrane and Maracic, 1991; Volney et al., 2002; Hall et al., 2019). However, the association of seroprevalence against CSP and PCR positivity for specific *Plasmodium* species (*P. vivax/P. simium* and *P. brasilianum/P. malariae*) argued against the cross-reactivity. Therefore, further experiments are still needed to confirm the circulation of *P. falciparum* in the Atlantic Forest and immune response studies using erythrocytic antigens of *P. falciparum* and other *Plasmodium* species, such as *P. malariae/P. brasilianum*.

Based on the high similarity between *P. simium* and *P. vivax*, recombinant proteins of three leading erythrocytic stage surface proteins of *P. vivax*, PvAMA-1, PvDBP II, and PvEBP-2, were used here to evaluate the antibody response of NPs from Atlantic forest. In general, 76% of NP showed antibodies against *P. vivax* erythrocytic antigens. PvEBP-2 was the most frequently detected antigen and with the highest levels of antibodies. Recently, PvEBP-2 was suggested as a novel ligand for a potential alternative invasion pathway of Duffy positive reticulocytes (Hester et al., 2013; Ntumngia et al., 2016). Papua New



Guinean children had IgG against PvEBP-2 correlated with protection against clinical malaria (França et al., 2017; He et al., 2019). The first evaluation of antibodies against *P. vivax* EBP-2 in non-human primates was undertaken here. High frequency of seroprevalence (63%) against MSP-1, another erythrocytic antigen, from different *Plasmodium* species was also demonstrated for animals from Atlantic forest in São Paulo and Santa Catarina states (Yamasaki et al., 2011; Monteiro et al., 2020). This seroprevalence was higher for free-living animals from the Atlantic forest than for animals from Amazon or Cerrado biome regions (Monteiro et al., 2020). These findings corroborate our suggestion of a high circulation of *Plasmodium* among NP in the Atlantic Forest area (Deane, 1992; de Pina-Costa et al., 2014; Brasil et al., 2017). Significant correlations of the humoral response against pre-erythrocytic

and erythrocytic antigens found herein have been also described in humans (França et al., 2017; He et al., 2019).

Free-living animals showed significantly higher levels of antibodies against PvCSP, PvEBP-2 and PvDBPII as compared to captive animals from Indaial/SC. This finding of high levels of antibodies in free-living animals can be attributed to the forest ecosystem of the region and closer proximity of free-living animals and anopheline species, which are responsible for the parasite transmission (Marrelli et al., 2007). No significant differences were found in the percentage of responders neither in levels of antibodies when were compared males and females NP, suggesting similar exposure to malaria infection. In humans, men from some endemic areas showed higher reactivity against malaria antigens, probably due to their occupation which might increase exposure to the malaria transmission

(Del Giudice et al., 1990; Kale et al., 2019). The humoral response against CSP peptides from different *Plasmodium* species was higher in adults than non-adult animals, suggesting that the humoral immune response is correlated with the cumulative exposure to malaria infection throughout their lives, as demonstrated in humans (Tapchaisri et al., 1985; Esposito et al., 1986; Griffin et al., 2015). No significant differences were observed in the frequency of responders against erythrocytic antigens of *P. vivax* comparing adult and non-adult animals. However, the levels of antibodies against PvEBP-2 and PvDBP-II were significantly higher in adults, suggesting that the magnitude of humoral response depends on the repetitive cycles of erythrocytic stages. Since this study was not designed for comparison between adult and non-adult monkeys and because of the difficulty to access non-adult animals, the number of adults is 5 times higher than non-adult animals. Therefore, these findings must be carefully analyzed. Although of this limitation, at least one comparison had a strong statistical power (DBP-II, 0.847), confirming that in fact adults might have stronger response for specific antigens. Moreover, in humans, the humoral immune response against erythrocytic antigens also increases with age due to repeated exposure to malaria parasites (Del Giudice et al., 1990; Kano et al., 2012; Hester et al., 2013; Griffin et al., 2015; Stanisic et al., 2015).

The level of antibodies and rate of seroprevalence against Pb/PmCSP were higher in NP infected by *P. brasilianum/P. malariae*. The seroprevalence against PvEBP-2 and PvDBP-II and level of antibodies against DBP-II were higher in *P. simium* infected NP. Similar results were observed in Papua New Guinean children with a concurrent *P. vivax* infection which had significantly higher IgG levels against PvDBP-II and PvEBP-2 (He et al., 2019). The absence of correlation between PCR positivity and antibody responses against the other antigens PvCSP and PvAMA-1 observed here was also previously observed in humans (Burkot et al., 1989; Kilombero Malaria Project, 1992; Campo et al., 2011; Pereira et al., 2018). However, in PCR negative monkeys, we cannot rule out the possibility of parasites being in hematopoietic niches, which would explain the absence of parasites in the peripheral circulation (Obaldia et al., 2018; Silva-Filho et al., 2020).

In Indaial and Joinville we sampled only *Alouatta guariba clamitans*, but in Guapimirim we included primates belonging to all Platyrrhini families. Thus, the evaluation of the immune responses among animals from Guapimirim provide an excellent opportunity to compare how each monkey family responds against *Plasmodium* sp. antigens under the same epidemiological conditions. Overall, most monkey members of the five families had IgG antibodies against at least one CSP repeat, 100% of Atelidae and Pitheciidae, 92% of Cebidae, and 50% of Callitrichidae. The reactivity was homogeneous across different peptides, i.e., most animals responded to all three CSP peptides. However, reactivity against *P. vivax* erythrocytic antigens was observed for some animals but not others. IgG antibodies against at least one of these antigens was detected in all specimens of Pitheciidae, in half of Atelidae specimens and half of Callitrichidae specimens, but in only 17% of Cebidae specimens. *Alouatta guariba clamitans* of Atelidae

family, from Atlantic Forest of São Paulo and Santa Catarina states, previously showed antibodies against CSP, MSP1₁₉ and crude blood stage antigens (by IFA) of *P. vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae/P. brasilianum* (Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011; Monteiro et al., 2020). Animals of Cebidae family previously showed antibodies against CSP peptides but did not against erythrocytic antigens, and animals of Callitrichidae family did not have antibodies against either pre-erythrocytic or erythrocytic antigens (MSP1₁₉ and crude blood stage antigens – IFA) for different *Plasmodium* species (Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011; Monteiro et al., 2020). Therefore, all families seem to be exposed to malaria transmission, but the establishment of blood malaria infection might only occur in Atelidae family, which could be the potential malaria reservoirs. Although, some species of Pitheciidae family also showed antibody response against erythrocytic antigens, they might not be important reservoirs in the Atlantic Forest because of the two studied species only *Callicebus personatus* is native of this region. Moreover, this conclusion must be taken with caution since some families were very poorly studied, in number of specimens and species. Interestingly, *Alouatta guariba clamitans* and *Brachyteles arachnoides*, species initially described infected by *P. simium* (Deane et al., 1968; Deane, 1992), showed antibodies against CSP and also erythrocytic antigens of *Plasmodium* sp. *Alouatta* is the genus with highest frequency of *Plasmodium* infection in the Atlantic forest (Deane, 1992; Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011; de Alvarenga et al., 2015; Alvarenga et al., 2017; Abreu et al., 2019). In conjunction with our findings of humoral immune response, this genus, particularly *A. g. clamitans* was suggested as the main potential reservoir of malaria in the Atlantic Forest (Abreu et al., 2019). However, the detection of gametocytes (sexual stage of parasite) and transmission experiments are still needed for evaluation of the potential for transmission and confirmation of their role as malaria reservoirs. Therefore, the growth of human intrusion in forest areas reinforces the need of the inclusion of the Atlantic Forest as malaria transmission area. In this region, malaria prevention and control depend on environmental education strategies for the local population and tourists, and epidemiological surveillance of zoonotic malaria.

Our results show that both male and females of neotropical primates from Brazilian Atlantic Forest have had contact with *Plasmodium* sporozoites. However, it seems that mainly adults of some species of Atelidae family constantly exposed to malaria transmission might develop an erythrocytic infection, potentially serving as reservoirs of malaria. Taken together, these data suggest that immune response recorded in naturally infected monkeys is similar to that reported in human exposed to malaria in endemic areas (Kano et al., 2012; França et al., 2017; Pereira et al., 2018; Kale et al., 2019).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Fiocruz Research Ethical Committee (CEUA license L037/2016) and by the Brazilian Ministry of Environment (SISBIO numbers 43375-4, 43375-6, 54707-137362-2, 52472-1, 28953-1).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CA, LC, JO, and GA designed and conception the study. GA, DA, APC, JS, AN, AP, SM, HP, VP, and ZH were responsible for sample collection. LM, HL, FK, IS, FN, JA, and JO were responsible for the production of *Plasmodium* proteins and peptides. GA, DA, MC, JS-A, and JO performed the experiments. GA, DA, TS, FK, JO, LC, CD-R, and CA analyzed and interpreted data. GA, DA, and CA wrote the first draft. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq - Grant nos. 457274/2014-0, 310477/2017-4), Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG - Grant no.

CBB-APQ-02620-15), Fiocruz Inova Grant for innovative products (VPPIS-004-FIO-18-16), and the Secretary for Health Surveillance of the Brazilian Ministry of Health (IOC-017-FIO-17 and IOC-028-FIO-18). This study was partially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the team involved in the free-living and captive howler monkeys' capture. We are grateful to the Academic Mobility Program of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) for supporting part of the experiments in the Laboratory of Immunoparasitology at Rio de Janeiro/RJ. GP was supported by the scholarship from CAPES. CF, LC, CD-R, TS, and IS are supported by the scholarship from CNPq. CD-R is also supported by "Cientistas do nosso Estado" scholarship from the Faperj.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.678996/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abreu, F. V. S., Santos, E. D., Mello, A. R. L., Gomes, L. R., Alvarenga, D. A. M., Gomes, M. Q., et al. (2019). Howler Monkeys are the Reservoir of Malarial Parasites Causing Zoonotic Infections in the Atlantic Forest of Rio De Janeiro. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13 (12), e0007906. doi: 10.1371/journal.pntd.0007906
- Alvarenga, D. A., Pina-Costa, A., Bianco, C. Jr., Moreira, S. B., Brasil, P., Pissinatti, A., et al. (2017). New Potential *Plasmodium Brasiliense* Hosts: Tamarin and Marmoset Monkeys (Family Callitrichidae). *Malar. J.* 16 (1), 71. doi: 10.1186/s12936-017-1724-0
- Barnwell, J. E. (1986). Antigens of *Plasmodium Vivax* Blood Stage Parasites Identified by Monoclonal Antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 81 (Suppl 2), 56–61. doi: 10.1590/S0074-02761986000600010
- Brasil, P., Zalis, M. G., de Pina-Costa, A., Siqueira, A. M., Júnior, C. B., Silva, S., et al. (2017). Outbreak of Human Malaria Caused by *Plasmodium Simium* in the Atlantic Forest in Rio De Janeiro: A Molecular Epidemiological Investigation. *Lancet Glob Health* 5 (10), 1038–1046. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30333-9
- Burkot, T. R., Graves, P. M., Wirtz, R. A., Brabin, B. J., Battistutta, D., Cattani, J. A., et al. (1989). Differential Antibody Responses to *Plasmodium Falciparum* and *P. Vivax* Circumsporozoite Proteins in a Human Population. *J. Clin. Microbiol.* 27 (6), 1346–1351. doi: 10.1128/JCM.27.6.1346-1351.1989
- Campo, J. J., Whitman, T. J., Freilich, D., Burgess, T. H., Martin, G. J., and Doolan, D. L. (2011). Toward a Surrogate Marker of Malaria Exposure: Modeling Longitudinal Antibody Measurements Under Outbreak Conditions. *PLoS One* 6 (7), e21826. doi: 10.1371/journal.pone.0021826
- Carpenter, C. R. (1965). "The Howlers of Barro Colorado Island," in *Primates Behavior* (New York: Holt, Rinehart and Winston), 250–291.
- Ceravolo, I. P., Bruña-Romero, O., Braga, E. M., Fontes, C. J., Brito, C. F., Souza, J. M., et al. (2005). Anti-*Plasmodium Vivax* Duffy Binding Protein Antibodies Measure Exposure to Malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72 (6), 675–681. doi: 10.4269/ajtmh.2005.72.675
- Cerutti, C., Boulos, M., Coutinho, A. F., Hatab, M. C. L. D., Falqueto, A., Rezende, H. R., et al. (2007). Epidemiologic Aspects of the Malaria Transmission Cycle in an Area of Very Low Incidence in Brazil. *Malar. J.* 19, 6–33. doi: 10.1186/1475-2875-6-33
- Coatney, G. R. (1971). The Simian Malaria: Zoonoses, Anthroponoses, or Both? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20 (6), 795–803. doi: 10.4269/ajtmh.1971.20.795
- Cochrane, A. H., Barnwell, J. W., Collins, W. E., and Nussenzweig, R. S. (1985). Monoclonal Antibodies Produced Against Sporozoites of the Human Parasite *Plasmodium Malariae* Abolish Infectivity of Sporozoites of the Simian Parasite *Plasmodium Brasiliense*. *Infect. Immune.* 50 (1), 58–61. doi: 10.1128/IAI.50.1.58-61.1985
- Cochrane, A. H., and Maracic, M. (1991). Blood Stage-Induced *Plasmodium Brasiliense* Infection in the Squirrel Monkey Induces Antibodies Which React With the Circumsporozoite Protein. *Infect. Immune.* 59 (3), 1180–1182. doi: 10.1128/IAI.59.3.1180-1182.1991
- Cochrane, A. H., Nardin, E. H., de Arruda, M., Maracic, M., Clavijo, P., Collins, W. E., et al. (1990). Widespread Reactivity of Human Sera With a Variant Repeat of the Circumsporozoite Protein of *Plasmodium Vivax*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43 (5), 446–451. doi: 10.4269/ajtmh.1990.43.446
- Conway, J. R., Lex, A., and Gehlenborg, N. (2017). UpSetR: An R Package for the Visualization of Intersecting Sets and Their Properties. *Bioinf. (Oxford England)* 33 (18), 2938–2940. doi: 10.1093/bioinformatics/btx364
- Costa, D. C., da Cunha, V. P., de Assis, G. M., de Souza Junior, J. C., Hirano, Z. M., de Arruda, M. E., et al. (2014). *Plasmodium Simium/Plasmodium Vivax* Infections in Southern Brown Howler Monkeys From the Atlantic Forest. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 109 (5), 641–653. doi: 10.1590/0074-0276130578
- Cox-Singh, J. (2012). Zoonotic Malaria: *Plasmodium Knowlesi*, an Emerging Pathogen. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25 (5), 530–536. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283558780
- da Fonseca, F. (1951). *Plasmodio De Primata do Brasil [Plasmodium of a Primate of Brazil]*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 49, 543–553. doi: 10.1590/s0074-02761951000100008
- de Alvarenga, D., Culleton, R., de Pina-Costa, A., Rodrigues, D. F., Bianco, C. J. R., Silva, S., et al. (2018). An Assay for the Identification of *Plasmodium Simium*

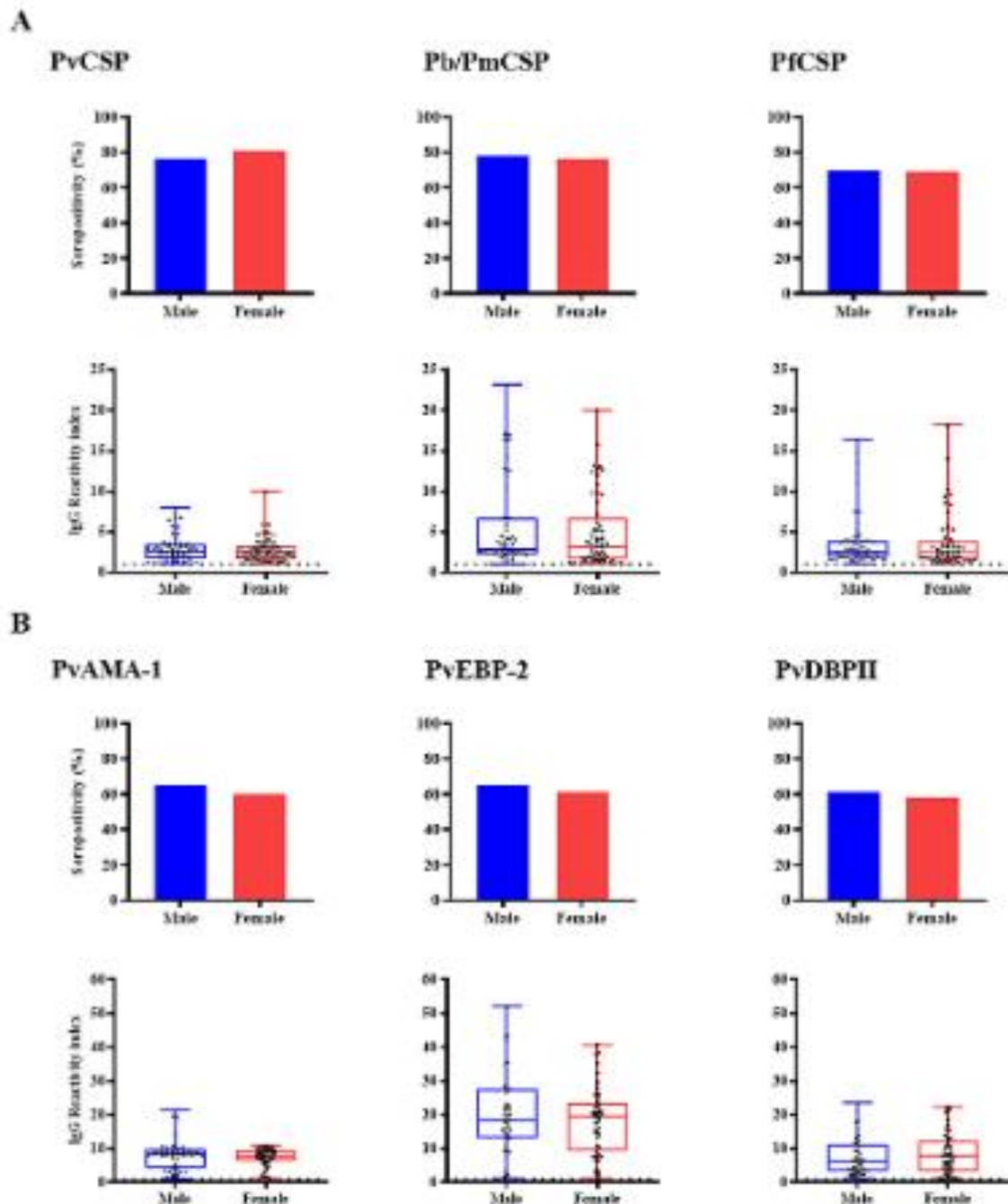
- Infection for Diagnosis of Zoonotic Malaria in the Brazilian Atlantic Forest. *Sci Rep.* 8 (1), 86. doi: 10.1038/s41598-017-18216-x
- de Alvarenga, D. A., de Pina-Costa, A., de Sousa, T. N., Pissinatti, A., Zalis, M. G., Suárez-Mutis, M. C., et al. (2015). Simian Malaria in the Brazilian Atlantic Forest: First Description of Natural Infection of Capuchin Monkeys (Cebinae Subfamily) by *Plasmodium Simium*. *Malar J.* 14, 81. doi: 10.1186/s12936-015-0606-6
- Deane, L. M. (1992). Simian Malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 87 (Suppl 3), 1–20. doi: 10.1590/s0074-02761992000700001
- Deane, L. M., Ferreira Neto, J., and Sítônio, J. G. (1968). Nôvo Hospedeiro Natural do *Plasmodium Simium* E do *Plasmodium Brasiliense*: O Mono, *Brachyteles Arachnoides* [a New Natural Host of *Plasmodium Simium* and *Plasmodium Brasiliense*: The Woolly Spider Monkey]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 10 (5), 287–288.
- de Arruda, M., Nardin, E. H., Nussenzweig, R. S., and Cochrane, A. H. (1989). Sero-Epidemiological Studies of Malaria in Indian Tribes and Monkeys of the Amazon Basin of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41 (4), 379–385. doi: 10.4269/ajtmh.1989.41.379
- Del Giudice, G., Lambert, P. H., Mendis, K., Pessi, A., and Tanner, M. (1990). Antibody Responses to *Plasmodium Falciparum* and *P. Vivax* Sporozoites in Areas With Stable and Unstable Malaria. *Bull. World Health Organ.* 68 (Suppl), 191–196.
- de Pina-Costa, A., Brasil, P., Di Santi, S. M., de Araujo, M. P., Suárez-Mutis, M. C., Santelli, A. C., et al. (2014). Malaria in Brazil: What Happens Outside the Amazonian Endemic Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 109 (5), 618–633. doi: 10.1590/0074-0276140228
- Duarte, A. M., Porto, M. A., Curado, I., Malafronte, R. S., Hoffmann, E. H., de Oliveira, S. G., et al. (2006). Widespread Occurrence of Antibodies Against Circumsporozoite Protein and Against Blood Forms of *Plasmodium Vivax*, *P. Falciparum* and *P. Malariae* in Brazilian Wild Monkeys. *J. Med. Primatol.* 35 (2), 87–96. doi: 10.1111/j.1600-0684.2006.00148.x
- Escalante, A. A., Barrio, E., and Ayala, F. J. (1995). Evolutionary Origin of Human and Primate Malaria: Evidence From the Circumsporozoite Protein Gene. *Mol. Biol. Evol.* 12 (4), 616–626. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040241
- Escalante, A. A., Freeland, D. E., Collins, W. E., and Lal, A. A. (1998). The Evolution of Primate Malaria Parasites Based on the Gene Encoding Cytochrome B From the Linear Mitochondrial Genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (14), 8124–8129. doi: 10.1073/pnas.95.14.8124
- Esposito, F., Lombardi, S., Modiano, D., Zavala, F., Reeme, J., Lamizana, et al. (1986). Immunity to *Plasmodium* Sporozoites: Recent Advances and Applications to Field Research. *Parasitologia* 28 (2-3), 101–105.
- Fandeur, T., Volney, B., Peneau, C., and de Thoisy, B. (2000). Monkeys of the Rainforest in French Guiana are Natural Reservoirs for *P. Brasiliense*/*P. Malariae* Malaria. *Parasitology* 120 (Pt1), 11–21. doi: 10.1017/s0031182099005168
- França, C. T., White, M. T., He, W. Q., Hostetler, J. B., Brewster, J., Frato, G., et al. (2017). Identification of Highly-Protective Combinations of *Plasmodium Vivax* Recombinant Proteins for Vaccine Development. *Elife* 6, e28673. doi: 10.7554/eLife.28673
- Goldman, I. F., Qari, S. H., Millet, P. G., Collins, W. E., and Lal, A. A. (1993). Circumsporozoite Protein Gene of *Plasmodium Simium*, a *Plasmodium Vivax*-Like Monkey Malaria Parasite. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57 (1), 177–180. doi: 10.1016/0166-6851(93)90257-x
- Griffin, J. T., Hollingsworth, T. D., Reyburn, H., Drakeley, C. J., Riley, E. M., and Ghani, A. C. (2015). Gradual Acquisition of Immunity to Severe Malaria With Increasing Exposure. *Proc. Biol. Sci.* 282 (1801), 20142657. doi: 10.1098/rspb.2014.2657
- Gu, Z., Eils, R., and Schlesner, M. (2016). Complex Heatmaps Reveal Patterns and Correlations in Multidimensional Genomic Data. *Bioinf. (Oxford England)* 32 (18), 2847–2849. doi: 10.1093/bioinformatics/btw313
- Guimarães, L. O., Bajaj, M. M., Wunderlich, G., Bueno, M. G., Röhe, F., Catão-Dias, J. L., et al. (2012). The Genetic Diversity of *Plasmodium Malariae* and *Plasmodium Brasiliense* From Human, Simian and Mosquito Hosts in Brazil. *Acta Trop.* 124 (1), 27–32. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.05.016
- Hall, C. E., Hagan, L. M., Bergmann-Leitner, E., Tosh, D. M., Bennett, J. W., Regules, J. A., et al. (2019). Mosquito Bite-Induced Controlled Human Malaria Infection With *Plasmodium Vivax* or *P. Falciparum* Generates Immune Responses to Homologous and Heterologous Preerythrocytic and Erythrocytic Antigens. *Infect. Immun.* 87 (3), e00541–e00518. doi: 10.1128/IAI.00541-18
- He, W. Q., Shakri, A. R., Bhardwaj, R., França, C. T., Stanicic, D. I., Healer, J., et al. (2019). Antibody Responses to *Plasmodium Vivax* Duffy Binding and Erythrocyte Binding Proteins Predict Risk of Infection and are Associated With Protection From Clinical Malaria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13 (2), e0006987. doi: 10.1371/journal.pntd.0006987
- Hester, J., Chan, E. R., Menard, D., Mercereau-Puijalon, O., Barnwell, J., Zimmerman, P. A., et al. (2013). De Novo Assembly of a Field Isolate Genome Reveals Novel *Plasmodium Vivax* Erythrocyte Invasion Genes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (12), e2569. doi: 10.1371/journal.pntd.0002569
- Hope, I. A., Hall, R., Simmons, D. L., Hyde, J. E., and Scaife, J. G. (1984). Evidence for Immunological Cross-Reaction Between Sporozoites and Blood Stages of a Human Malaria Parasite. *Nature* 308 (5955), 191–194. doi: 10.1038/308191a0
- Kale, S., Yadav, C. P., Rao, P. N., Shalini, S., Eapen, A., Srivastava, H. C., et al. (2019). Antibody Responses Within Two Leading *Plasmodium Vivax* Vaccine Candidate Antigens in Three Geographically Diverse Malaria-Endemic Regions of India. *Malar J.* 18 (1), 425. doi: 10.1186/s12936-019-3066-6
- Kano, F. S., Sanchez, B. A., Sousa, T. N., Tang, M. L., Saliba, J., Oliveira, F. M., et al. (2012). *Plasmodium Vivax* Duffy Binding Protein: Baseline Antibody Responses and Parasite Polymorphisms in a Well-Consolidated Settlement of the Amazon Region. *Trop. Med. Int. Health* 17 (8), 989–1000. doi: 10.1111/j.1365-3156.2012.03016.x
- Kilombero Malaria Project (1992). The Level of Anti-Sporozoite Antibodies in a Highly Endemic Malaria Area and its Relationship With Exposure to Mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86 (5), 499–4504. doi: 10.1016/0035-9203(92)90084-p
- Lalremruata, A., Magris, M., Vivas-Martinez, S., Koehler, M., Esen, M., Kempaiah, P., et al. (2015). Natural Infection of *Plasmodium Brasiliense* in Humans: Man and Monkeys Share Quartan Malaria Parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine* 2 (9), 1186–1192. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.07.033
- Laporta, G. Z., Burattini, M. N., Levy, D., Fukuya, L. A., de Oliveira, T. M., Maselli, L. M., et al. (2015). *Plasmodium Falciparum* in the Southeastern Atlantic Forest: A Challenge to the Bromeliad-Malaria Paradigm? *Malar J.* 14, 181. doi: 10.1186/s12936-015-0680-9
- Lourenço-de-Oliveira, R., and Deane, L. M. (1995). Simian Malaria At Two Sites in the Brazilian Amazon. I—the Infection Rates of *Plasmodium Brasiliense* in non-Human Primates. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 90 (3), 331–339. doi: 10.1590/s0074-02761995000300004
- Marrelli, M. T., Malafronte, R. S., Sallum, M. A., and Natal, D. (2007). *Kerteszia* Subgenus of Anopheles Associated With the Brazilian Atlantic Rainforest: Current Knowledge and Future Challenges. *Malar J.* 6, 127. doi: 10.1186/1475-2875-6-127
- Maselli, L. M., Levy, D., Laporta, G. Z., Monteiro, A. M., Fukuya, L. A., Ferreira-da-Cruz, M. F., et al. (2014). Detection of *Plasmodium Falciparum* and *Plasmodium Vivax* Subclinical Infection in non-Endemic Region: Implications for Blood Transfusion and Malaria Epidemiology. *Malar J.* 6 (13), 224. doi: 10.1186/1475-2875-13-224
- Ministerio da Saude (2020). *Epidemiological Report – Malaria 2020. Boletim Epidemiológico* (Especial Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde). Available at: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/03/boletim_especial_malaria_1dez20_final.pdf (Accessed March 2, 2021).
- Monteiro, E. F., Fernandez-Becerra, C., Araujo, M., Messias, M. R., Ozaki, L. S., Duarte, A., et al. (2020). Naturally Acquired Humoral Immunity Against Malaria Parasites in Non-Human Primates From the Brazilian Amazon, Cerrado and Atlantic Forest. *Pathogens* 9 (7), 525. doi: 10.3390/pathogens9070525
- Mourier, T., Alvarenga, D. A. M., Kaushik, A., Pina-Costa, A., Douvropoulou, O., Guan, Q., et al. (2019). The Genome of the Zoonotic Malaria Parasite *Plasmodium Simium* Reveals Adaptations to Host-Switching. *BioRxiv.* doi: 10.1101/841171
- Numngia, F. B., Thomson-Luque, R., Torres, L., Gunalan, K., Carvalho, I. H., and Adams, J. H. (2016). A Novel Erythrocyte Binding Protein of *Plasmodium Vivax* Suggests an Alternate Invasion Pathway Into Duffy-Positive Reticulocytes. *mBio* 7 (4), e01261–e01216. doi: 10.1128/mBio.01261-16
- Nunes, A., Alvarenga, D., de Souza Junior, J. C., Peruchi, A. R., Gonçalves, G., Hirano, Z., et al. (2020). *Plasmodium* Infection and its Association With

- Biochemical and Haematological Parameters in Free-Living *Alouatta Guariba Clamitans* (Cabrer) (Primates: Atelidae) in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 114, e190210. doi: 10.1590/0074-02760190210
- Obaldia, N.3., Meibalan, E., Sa, JM, Ma, S., MA, C., Mejia, P., et al. (2018). Bone Marrow is a Major Parasite Reservoir in *Plasmodium Vivax* Infection. *mBio* 9 (3), e00625–e00618. doi: 10.1128/mBio.00625-18
- Oliveira-Ferreira, J., Pratt-Riccio, L. R., Arruda, M., Santos, F., Daniel Ribeiro, C. T., Goldberg, A. C., et al. (2004). HLA Class II and Antibody Responses to Circumsporozoite Protein Repeats of *P. Vivax* (VK210, VK247 and P. Vivax-Like) in Individuals Naturally Exposed to Malaria. *Acta Trop.* 92 (1), 63–69. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.02.011
- Pereira, V. A., Sánchez-Arcila, J. C., Vasconcelos, M., Ferreira, A. R., de Souza Videira, L., Teva, A., et al. (2018). Evaluating Seroprevalence to Circumsporozoite Protein to Estimate Exposure to Three Species of *Plasmodium* in the Brazilian Amazon. *Infect. Dis. Poverty* 7 (1), 46. doi: 10.1186/s40249-018-0428-1
- Pires, C. V., Alves, J., Lima, B., Paula, R. B., Costa, H. L., Torres, L. M., et al. (2018). Blood-Stage *Plasmodium Vivax* Antibody Dynamics in a Low Transmission Setting: A Nine Year Follow-Up Study in the Amazon Region. *PLoS One* 13 (11), e0207244. doi: 10.1371/journal.pone.0207244
- R Core Team (2020) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing (Vienna, Austria). Available at: <http://www.r-project.org/index.html> (Accessed February 10, 2021).
- Santos, E. A., Suciupira, L., de Oliveira Martins, B. M., de Paula Souza E Guimarães, R. J., Catete, C. P., de Souza, R., et al. (2019). VK210 and VK247 Genotypes of *Plasmodium Vivax* in Anopheline Mosquitoes From Brazilian Amazon. *Sci. Rep.* 9 (1), 1–6. doi: 10.1038/s41598-019-45809-5
- Seed, T. M. (1976). *Plasmodium Simium*: Ultrastructure of Erythrocytic Phase. *Exp. Parasitol.* 39 (2), 262–276. doi: 10.1016/0014-4894(76)90126-0
- Seidelin, H. (1912). Notes on Some Blood-Parasites in Man and Mammals. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 5:4, 501–508. doi: 10.1080/00034983.1912.11686370
- Silva-Filho, J. L., Lacerda, M., Recker, M., Wassmer, S. C., Marti, M., and Costa, F. (2020). *Plasmodium Vivax* in Hematopoietic Niches: Hidden and Dangerous. *Trends Parasitol.* 36 (5), 447–458. doi: 10.1016/j.pt.2020.03.002
- Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thalthong, S., and Brown, K. N. (1993). Identification of the Four Human Malaria Parasite Species in Field Samples by the Polymerase Chain Reaction and Detection of a High Prevalence of Mixed Infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58 (2), 283–292. doi: 10.1016/0166-6851(93)90050-8
- Stanisic, D. I., Fowkes, F. J., Koinari, M., Javati, S., Lin, E., Kiniboro, B., et al. (2015). Acquisition of Antibodies Against *Plasmodium Falciparum* Merozoites and Malaria Immunity in Young Children and the Influence of Age, Force of Infection, and Magnitude of Response. *Infect. Immun.* 83 (2), 646–660. doi: 10.1128/IAI.02398-14
- Tapchaisri, P., Asavanich, A., Limsuwan, S., Tharavanij, S., and Harinasuta, K. T. (1985). Antibodies Against Malaria Sporozoites in Patients With Acute Uncomplicated Malaria and Patients With Cerebral Malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34 (5), 831–836. doi: 10.4269/ajtmh.1985.34.831
- Tazi, L., and Ayala, F. J. (2011). Unresolved Direction of Host Transfer of *Plasmodium Vivax* V. P. *Simium* and *P. Malariae* V. P. *Brasiliense*. *Infect. Genet. Evol.* 11 (1), 209–221. doi: 10.1016/j.meegid.2010.08.007
- Volney, B., Pouliquen, J. F., De Thoisy, B., and Fandeur, T. (2002). A Seroprevalence Study of Malaria in Human and Monkey Populations in French Guiana. *Acta Trop.* 82 (1), 11–23. doi: 10.1016/s0001-706x(02)00036-0
- World Health Organization (2020) *World Malaria Report 2020: 20 Years of Global Progress and Challenges* (Geneva: World Health Organization). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791> (Accessed November 11, 2020).
- Yamasaki, T., Duarte, A. M., Curado, I., Summa, M. E., Neves, D. V., Wunderlich, G., et al. (2011). Detection of Etiological Agents of Malaria in Howler Monkeys From Atlantic Forests, Rescued in Regions of São Paulo City, Brazil. *J. Med. Primatol.* 40 (6), 392–400. doi: 10.1111/j.1600-0684.2011.00498.x

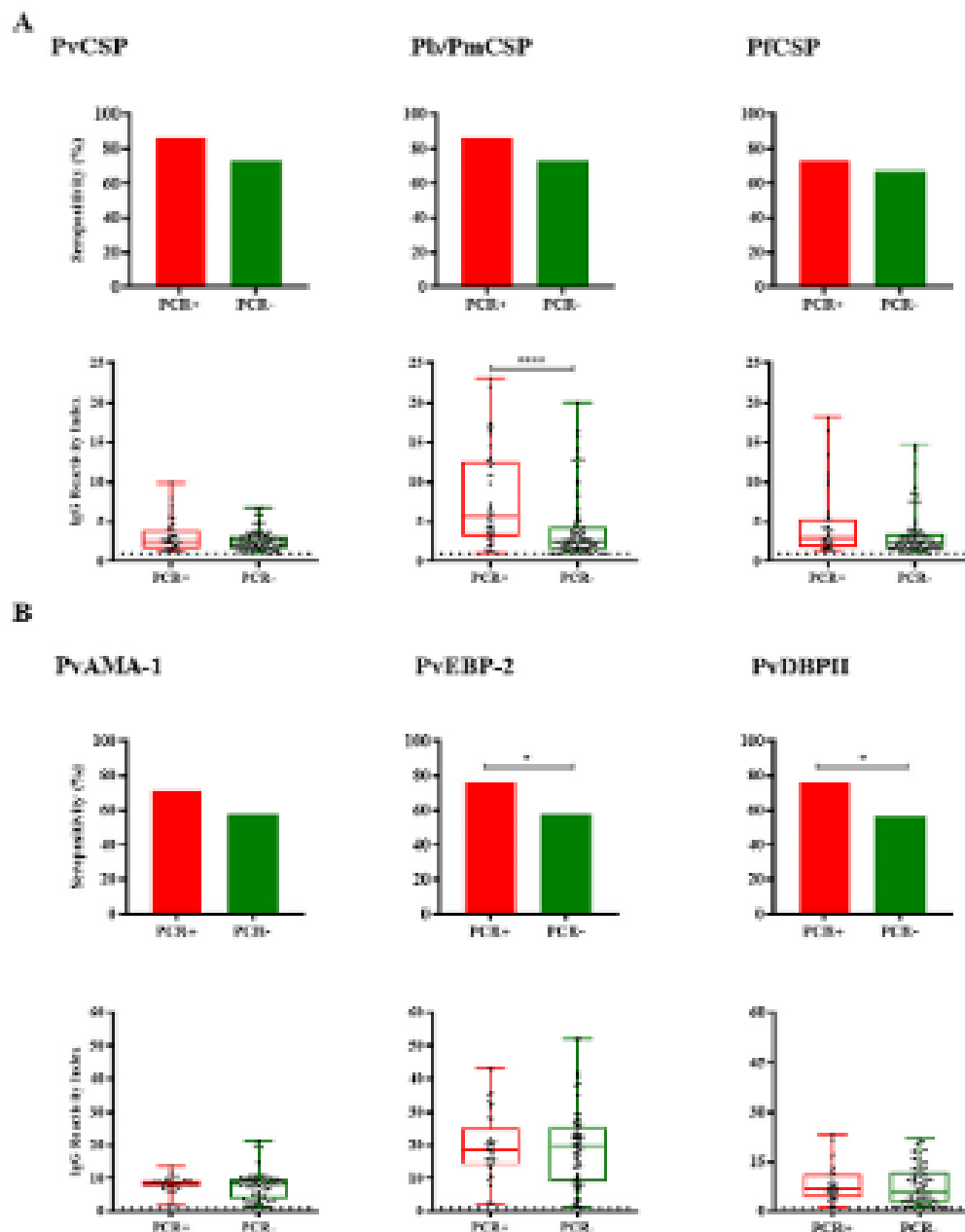
Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer TO declared a shared affiliation, with no collaboration, with one of the authors, IS, to the handling editor at the time of review.

Copyright © 2021 Assis, Alvarenga, Costa Pereira, Sánchez-Arcila, de Pina Costa, Souza Junior, Nunes, Pissinatti, Moreira, de Menezes Torres, Costa, da Penha Tinoco, Pereira, Soares, Sousa, Ntumngia, Adams, Kano, Hirano, Daniel-Ribeiro, Oliveira Ferreira, Carvalho and Alves de Brito. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Supplementary Figure 1 Association between antibody responses and sex. **(A)** Seropositivity and reactivity index (RI) of IgG antibodies against CSP repeats. **(B)** Seropositivity and RI of IgG antibodies against *Plasmodium vivax* erythrocytic antigens. RI>1 was considered positive (dotted line). The filled bars indicate the percentage of NP with RI>1. Data expressed as individual RI values (dots) and median with the interquartile range (boxes). PvCSP: CSP repeats representing *P. vivax* CSP variants (VK210, VK247, and *P. vivax*-like); Pb/PmCSP: CSP repeat of *P. brasilianum/P. malariae*; PfCSP: CSP repeat of *P. falciparum*; PvAMA-1: *P. vivax* Apical membrane antigen – 1; PvEBP-2: *P. vivax* Erythrocyte Binding Protein 2; PvDBPII: *P. vivax* Duffy Binding Protein region II. Male: blue; Female: red. No comparison showed a statistically significant difference.



Supplementary Figure 2 Association of antibody responses and active malaria infection. (A) IgG antibodies against CSP repeats and **(B)** against *Plasmodium vivax* erythrocytic antigens. RI>1 was considered positive (dotted line). The filled bars indicate the percentage of NP with RI>1. Data expressed as individual RI values (dots) and median with the interquartile range (boxes). PvCSP: CSP repeats representing *P. vivax* CSP repeats (VK210, VK247, and *P. vivax*-like); Pb/PmCSP: CSP repeat of *P. brasilianum/P. malariae*; PfCSP: CSP repeat of *P. falciparum*; PvAMA-1: *P. vivax* Apical membrane antigen – 1; PvEBP-2: *P. vivax* Erythrocyte Binding Protein 2; PvDBPII: *P. vivax* Duffy Binding Protein region II. PCR+: red; PCR-: green. Differences statistically significant were indicated by asterisk (* P<0.05; **** P<0.0001).

Study area	Animal code	Family	Species	Sex ^a	Age ^b	Captive/ Free-living	Diagnosis of <u>infection^c</u>
Indaial/SC	BL 1		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL 2		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL10		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	Ps
Indaial/SC	BL11		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	BL12		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL13		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	BL14		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL15		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	NA	Captive	N
Indaial/SC	BL16		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL17		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	<u>BL18</u>		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL22		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL25		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL30		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	BL31		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	BL32		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	BL33		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	BL34		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	<u>BL35</u>		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	BL36		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	BL37		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	<u>BL38</u>		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL39		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL40		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL41		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	<u>BL42</u>		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	<u>BL43</u>		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	<u>BL44</u>		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	<u>BL45</u>		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL46		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL47		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	NA	Captive	N
Indaial/SC	BL48	Atelidae	<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	BL49		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	BL50		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL51		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	N
Indaial/SC	BL62		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	Ps
Indaial/SC	BL64		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	NA	Free-living	Ps
Indaial/SC	BL68		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Indaial/SC	BL69		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	Ps
Indaial/SC	BL77		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	<u>BL83</u>		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Indaial/SC	BL84		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	N
Indaial/SC	BL85		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Indaial/SC	BL86		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Indaial/SC	<u>BL87</u>		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Indaial/SC	BL90		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Indaial/SC	BL91		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Indaial/SC	BL92		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Indaial/SC	Bugio SARA		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	N
Indaial/SC	Bugio 2		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	NA	captive	N
Indaial/SC	Bugio 3		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	NA	captive	Ps
Indaial/SC	Bugio 4		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	captive	N
Indaial/SC	Bugio 5		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	NA	captive	N
Indaial/SC	Bugio 6		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	captive	N
Indaial/SC	Bugio 7		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	captive	Ps
Indaial/SC	Bugio 8		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	captive	N
Indaial/SC	Bugio 9		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	NA	captive	N
Indaial/SC	Bugio 10		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	NA	captive	N
Indaial/SC	Bugio 12		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	captive	Ps
Indaial/SC	Bugio 13		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	NA	captive	N
Indaial/SC	Bugio 14		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	NA	captive	N
Indaial/SC	Bugio 15		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	captive	N

Indaial/SC	Bugio 19		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	captive	N
Indaial/SC	Bugio 20		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	NA	captive	Ps
Indaial/SC	Bugio 21		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	NA	captive	Ps
Indaial/SC	Bugio 22		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	captive	N
Indaial/SC	Bugio 23		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	captive	N
Indaial/SC	Bugio 26		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	captive	N
Indaial/SC	Bugio 31		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	captive	N
Indaial/SC	Bugio 33		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	captive	N
Indaial/SC	Bugio 35		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	NA	captive	N
Indaial/SC	Bugio 36		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	captive	N
Indaial/SC	Bugio 37		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	captive	Pb/Pm
Indaial/SC	Massaranduba		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	captive	N
Indaial/SC	Bugio 11 01		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	captive	N
Joinville/SC	1 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	Mixed
Joinville/SC	2 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	Mixed
Joinville/SC	3 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	Mixed
Joinville/SC	4 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	Mixed
Joinville/SC	5 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	Mixed
Joinville/SC	6 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Joinville/SC	9 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	Ps
Joinville/SC	10 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	Pb/Pm
Joinville/SC	11 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	NA	Free-living	Ps
Joinville/SC	12 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Joinville/SC	13 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	Pb/Pm
Joinville/SC	14 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	Mixed
Joinville/SC	15 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	Ps
Joinville/SC	16 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Joinville/SC	17 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	Mixed
Joinville/SC	18 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	N
Joinville/SC	19 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Joinville/SC	20 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	NA	Free-living	Ps
Joinville/SC	21 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	NA	Free-living	Mixed
Joinville/SC	22 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	Ps
Joinville/SC	23 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	N
Joinville/SC	24 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	NA	Free-living	Pb/Pm
Joinville/SC	25 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	NA	Free-living	Ps
Joinville/SC	26 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	NA	Free-living	Mixed
Joinville/SC	27 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	Mixed
Joinville/SC	28 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	NA	Free-living	Mixed
Joinville/SC	29 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	Mixed
Joinville/SC	31 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	Ps
Joinville/SC	32 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	Ps
Joinville/SC	33 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	Ps
Joinville/SC	35 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	NA	Free-living	N
Joinville/SC	36 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Joinville/SC	37 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	N
Joinville/SC	41 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	N
Joinville/SC	43 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	Mixed
Joinville/SC	45 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Joinville/SC	46 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Free-living	N
Joinville/SC	47 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	N
Joinville/SC	49 PCBR		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Free-living	Mixed
Guapimirim/RJ	2443		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	Pb/Pm
Guapimirim/RJ	2576		<i>Alouatta Caraya</i>	M	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2049		<i>Brachyteles grachnoides</i>	F	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2263		<i>Brachyteles grachnoides</i>	M	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	3078		<i>Brachyteles grachnoides</i>	M	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2619		<i>Ateles paniscus</i>	F	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	3636		<i>Alouatta g. clamitans</i>	M	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	3622		<i>Alouatta g. clamitans</i>	F	A	Captive	Pb/Pm
Guapimirim/RJ	2203	Aotidae	<i>Aotus nigriceps</i>	M	A	Captive	Pb/Pm
Guapimirim/RJ	2299	Callitrichidae	<i>Saguinus midas</i>	M	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2359		<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	F	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2435		<i>Leontopithecus rosalia</i>	M	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2390		<i>Mico humeralifer</i>	M	A	Captive	Pb/Pm
Guapimirim/RJ	1624	Cebidae	<i>Sapajus xanthosternus</i>	M	A	Captive	N

Guapimirim/RJ	2005		<i>Sapajus xanthosternus</i>	F	A	Captive	Pb/Pm
Guapimirim/RJ	2046		<i>Sapajus xanthosternus</i>	F	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2098		<i>Sapajus xanthosternus</i>	F	A	Captive	Ps
Guapimirim/RJ	2110		<i>Sapajus robustus</i>	F	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2125		<i>Sapajus xanthosternus</i>	F	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2135		<i>Sapajus xanthosternus</i>	F	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2183		<i>Sapajus xanthosternus</i>	F	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2207		<i>Sapajus robustus</i>	M	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2297		<i>Sapajus robustus</i>	F	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2324		<i>Sapajus xanthosternus</i>	F	A	Captive	Ps
Guapimirim/RJ	2360		<i>Sapajus robustus</i>	F	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2388		<i>Sapajus xanthosternus</i>	M	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2392		<i>Sapajus xanthosternus</i>	F	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2501		<i>Cebus sp.*</i>	M	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2503		<i>Cebus sp.*</i>	F	A	Captive	Ps
Guapimirim/RJ	2504		<i>Cebus sp.*</i>	F	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2536		<i>Sapajus xanthosternus</i>	M	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2559		<i>Cebus sp.*</i>	F	A	Captive	Ps
Guapimirim/RJ	2564		<i>Sapajus robustus</i>	M	A	Captive	Ps
Guapimirim/RJ	2456		<i>Sapajus robustus</i>	M	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2539		<i>Sapajus xanthosternus</i>	M	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2592		<i>Sapajus xanthosternus</i>	M	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2208		<i>Sapajus robustus</i>	F	A	Captive	N
Guapimirim/RJ	2466	<i>Pitheciidae</i>	<i>Callicebus personatus</i>	F	A	Captive	Pb/Pm
Guapimirim/RJ	2302		<i>Cacajao melanocephalus</i>	F	A	Captive	Ps
Guapimirim/RJ	2620		<i>Cacajao melanocephalus</i>	F	A	Captive	Pb/Pm

Supplementary Table 1. Characteristics of studied neotropical primates from three areas of Atlantic Forest. a: F= Female; M= Male; b: age estimated according to (Carpenter, 1965) A= Adult (including subadult); NA= Non Adults (juvenile); c: Molecular diagnosis of *Plasmodium* sp. were performed by (Snounou et al., 1993; de Alvarenga et al., 2018). Mixed= mixed infection (*P. simium*+ *P. brasilianum*/*P. malariae*), Pb/Pm= *P. brasilianum*/*P. malariae*; Ps = *P. simium*, N= negative.

5.2 Artigo 2



OPEN ACCESS

EDITED BY
Igor Cestari,
McGill University, CanadaREVIEWED BY
Yaw Aniwah,
University of Ghana, Ghana
Nimar Silvio Moretti,
Federal University of São Paulo, Brazil*CORRESPONDENCE
Cristiana Ferreira Alves de Brito
✉ cristiana.brito@fiocruz.brRECEIVED 19 February 2023
ACCEPTED 11 August 2023
PUBLISHED 27 September 2023CITATION
Assis GMPd, Alvarenga DAMd,
Souza LB, Sánchez-Arcila JC, Silva EF,
Pina-Costa Ad, Gonçalves GHP,
Souza Jr JC, Nunes AJD, Pissinatti A,
Moreira SB, Torres LM, Costa HL,
Tinoco HP, Pereira VS, Soares IS,
Souza TN, Ntumngia FB, Adams JH,
Kano FS, Hirano ZMB, Pratt-Riccio LR,
Daniel-Ribeiro CT, Ferreira JO,
Carvalho LH and Alves de Brito CF (2023)
IgM antibody responses against
Plasmodium antigens in neotropical
primates in the Brazilian Atlantic Forest.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 13:1169552.
doi: 10.3389/fcimb.2023.1169552COPYRIGHT
© 2023 Assis, Alvarenga, Souza,
Sánchez-Arcila, Silva, Pina-Costa, Gonçalves,
Souza, Nunes, Pissinatti, Moreira, Torres,
Costa, Tinoco, Pereira, Soares, Sousa,
Ntumngia, Adams, Kano, Hirano,
Pratt-Riccio, Daniel-Ribeiro, Ferreira,
Carvalho and Alves de Brito. This is an
open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

IgM antibody responses against *Plasmodium* antigens in neotropical primates in the Brazilian Atlantic Forest

Gabriela Maíra Pereira de Assis¹,
Denise Anete Madureira de Alvarenga¹, Luisa Braga e Souza¹,
Juan Camilo Sánchez-Arcila², Eduardo Fernandes e Silva³,
Anielle de Pina-Costa^{4,5,6,7},
Gustavo Henrique Pereira Gonçalves^{8,9},
Júlio César de Souza Junior⁸, Ana Julia Dutra Nunes^{8,9,10},
Alcides Pissinatti^{11,12}, Sílvia Bahadrian Moreira¹¹,
Leticia de Menezes Torres¹, Helena Lott Costa¹,
Hertandes da Penha Tinoco¹³, Valéria do Socorro Pereira¹³,
Irene da Silva Soares¹⁴, Taís Nóbrega de Sousa¹,
Francis Babila Ntumngia¹⁵, John H. Adams¹⁵, Flora Satiko Kano¹,
Zelinda Maria Braga Hirano^{8,9,10}, Lillian Rose Pratt-Riccio⁶,
Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro^{5,6}, Joseli Oliveira Ferreira¹⁶,
Luzia Helena Carvalho¹ and Cristiana Ferreira Alves de Brito^{1*}¹Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular e Imunologia da malária, Instituto René Rachou/Fiocruz Minas, Belo Horizonte, Brazil, ²School of Natural Sciences, Molecular and Cell Biology Department, University of California, Merced, Merced, CA, United States, ³Vice-diretoria de Ensino, Instituto René Rachou/Fiocruz Minas, Belo Horizonte, Brazil, ⁴Laboratório de Doenças Febris Agudas, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária (CPD-Mal), Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ⁶Laboratório de Pesquisa em Malária, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ⁷Escola de Enfermagem Aurora de Afonso Costa, Departamento de Doenças infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brazil, ⁸Fundação Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau, Brazil, ⁹Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial, Indaial, Brazil, ¹⁰Programa de conservação do Bugio Ruivo, Perini Business Park, Joinville, Brazil, ¹¹Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), Instituto Estadual do Ambiente (INEA), Guapimirim, Brazil, ¹²Centro Universitário Serra dos Órgãos (Unifeso), Teresópolis, Brazil, ¹³Fundação de Parques Municipais e Zoológica (FPMZB), Belo Horizonte, Brazil, ¹⁴Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ¹⁵Center for Global Health and Infectious Diseases Research, College of Public Health, University of South Florida, Tampa, FL, United States, ¹⁶Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

Introduction: Zoonotic transmission is a challenge for the control and elimination of malaria. It has been recorded in the Atlantic Forest, outside the Amazon which is the endemic region in Brazil. However, only very few studies have assessed the antibody response, especially of IgM antibodies, in Neotropical primates (NP). Therefore, in order to contribute to a better understanding of the immune response in different hosts and facilitate the identification of potential reservoirs, in this study, naturally acquired IgM antibody responses against *Plasmodium* antigens were evaluated, for the first time, in NP from the Atlantic Forest.

Methods: The study was carried out using 154 NP samples from three different areas of the Atlantic Forest. IgM antibodies against peptides of the circumsporozoite protein (CSP) from different *Plasmodium* species and different erythrocytic stage antigens were detected by ELISA.

Results: Fifty-nine percent of NP had IgM antibodies against at least one CSP peptide and 87% against at least one *Plasmodium vivax* erythrocytic stage antigen. Levels of antibodies against PvAMA-1 were the highest compared to the other antigens. All families of NP showed IgM antibodies against CSP peptides, and, most strikingly, against erythrocytic stage antigens. Generalized linear models demonstrated that IgM positivity against PvCSP and PvAMA-1 was associated with PCR-detectable blood-stage malaria infection and the host being free-living. Interestingly, animals with IgM against both PvCSP and PvAMA-1 were 4.7 times more likely to be PCR positive than animals that did not have IgM for these two antigens simultaneously.

Discussion: IgM antibodies against different *Plasmodium* spp. antigens are present in NP from the Atlantic Forest. High seroprevalence and antibody levels against blood-stage antigens were observed, which had a significant association with molecular evidence of infection. IgM antibodies against CSP and AMA-1 may be used as a potential marker for the identification of NP infected with *Plasmodium*, which are reservoirs of malaria in the Brazilian Atlantic Forest.

KEYWORDS

malaria, *Plasmodium*, IgM antibodies, neotropical primates, Atlantic forest, pre-erythrocytic stage antigen, erythrocytic stage antigens

Introduction

Malaria remains a critical public health concern despite all the efforts to control the disease around the world. The World Health Organization estimated 247 million malaria cases and 619,000 deaths in 2021 (World Health Organization, 2022). In Brazil, around 140,000 cases were reported in 2021, of which 83% were caused by *P. vivax*, 17% by *Plasmodium falciparum*, and <1% by *Plasmodium malariae*

Abbreviations: NP, Neotropical primates; CEPESBI, Centre for Biological Research of Indaial; FURB, University Regional of Blumenau; PCR, Polymerase Chain Reaction; ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay; CPRJ, Centre of Primatology of Rio de Janeiro; CSP, Circumsporozoite Protein; IgM, immunoglobulin M; PvcCSP, variant classic VK210 of the *P. vivax* CSP; PvkCSP, variant VK247 of the *P. vivax* CSP; PvlCSP, variant *P. vivax*-like of the *P. vivax* CSP; PvDBPII, domain II of Duffy binding protein of *P. vivax*; PvAMA-1, Apical membrane antigen 1 of *P. vivax*; PvEBP-2, Erythrocyte binding protein 2; PvMSP1₁₉, Fragment of 19kDa of the Merozoite surface protein 1 of *P. vivax*; PmMSP1₁₉, Fragment of 19kDa of the Merozoite surface protein 1 of *P. malariae*; PmMSP1₁₉, Fragment of 19kDa of the Merozoite surface protein 1 of *P. falciparum*; OD_s, optical densities; RI, reactivity index; SD, Standard deviation; Pb/PmCSP, Circumsporozoite protein repeats of *P. brasilianum/P. malariae*; PkCSP, Circumsporozoite protein repeats of *P. falciparum*; Pb/PmPCR+, amplification positive in PCR for *P. brasilianum*; PsPCR+, amplification positive in PCR for *P. simium*.

(SVS/MS, 2022a). More than 99% of malaria cases in Brazil occur in the Amazon region. However, autochthonous cases and sporadic outbreaks of malaria occur outside the Amazonian region and are of great concern because of the high mortality rate associated with such infections (SVS/MS, 2022a). Between 2010 and 2021, more than 8000 cases of malaria were confirmed outside the Amazon region, including those occurring in the Atlantic Forest region along the eastern Atlantic coast of Brazil (SVS/MS, 2022b).

One of the greatest challenges for the control and elimination of malaria in the world is zoonotic transmission. The huge impact of zoonotic transmission of malaria was recently described in South-East Asia, which was caused by *P. knowlesi*, a non-human primate malaria parasite (Cox-Singh, 2012). In Brazil, there are two malaria parasite species that infect Neotropical primates (NP): *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*. *Plasmodium simium* infects primates of Atelidae, Cebidae, and Pitheciidae families in the Atlantic Forest from south and southeastern Brazil (da Fonseca, 1951; Deane, 1992; de Alvarenga et al., 2015). The primate species most frequently infected with *P. simium* is *Alouatta guariba clamitans* (southern brown howler monkey) (Deane, 1992; de Alvarenga et al., 2015; Abreu et al., 2019). *Plasmodium brasilianum* infects primates of all NP families found in Central America to southern Brazil (Seidelin, 1912; Deane, 1992; Lourenço-de-Oliveira and Deane, 1995; Lalremruata et al., 2015; Alvarenga et al., 2017). *Plasmodium simium* and *P. brasilianum* are similar in morphology, genetics, and immunology to human

Plasmodium species, *P. vivax*, and *P. malariae*, respectively (Coatney, 1971; Cochrane et al., 1985; Barnwell, 1986; de Aruda et al., 1989; Deane, 1992; Escalante et al., 1995; Fandeur et al., 2000; Tazi and Ayala, 2011). Zoonotic transmission of *P. brasilianum/Plasmodium malariae* between NP and indigenous people from the Yanomami community in the Venezuelan Amazon was confirmed using molecular biology techniques (Lalremruata et al., 2015). In Brazil, an outbreak of zoonotic human malaria caused by *P. simium* was recently reported in the Atlantic Forest region in the state of Rio de Janeiro (Brasil et al., 2017; Mourier et al., 2021).

The immune response to malaria parasites is complex and occurs against distinct antigenic combinations, composed of antigens from each stage of the parasite's life cycle (Struik and Riley, 2004). The vertebrate host uses different effector mechanisms involving innate and adaptive immunity. It is well-established that in humans, naturally acquired IgG antibody responses are associated with protective clinical immunity to malaria (Cohen et al., 1961; Sabchareon et al., 1991). Although IgM may play a role in malaria immunity, such a role is not well defined as of yet (Pleass et al., 2016; Stone and Lund, 2016). Recently, IgM antibodies were proposed to have a much greater role than just the early response generally stated in classical immunology books (Boonyaratankornkit and Taylor, 2019). Memory B cells have recently been shown in experimental models to produce specific IgM against *Plasmodium* sp. and dominate the early memory response to recurrent malaria infections, providing evidence of additional mechanisms by which the immune system may control infection (Couper et al., 2005; Bohannon et al., 2016; Krishnamurthy et al., 2016). Furthermore, a recent study by Boyle et al. associated higher levels of IgM against *P. falciparum* with a reduced risk of clinical malaria in children (Boyle et al., 2019). Studies evaluating human naturally acquired IgM immune responses against different erythrocytic stage antigens have been conducted in different areas of Brazil (Rodrigues et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Riccio et al., 2013; Cassiano et al., 2016; Medeiros et al., 2020; Lima et al., 2022; Schappo et al., 2022). However, only a few studies have looked at the naturally acquired immune response of NP exposed to *Plasmodium* infection, with all such studies focusing on IgG antibodies (Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011; Costa et al., 2014; Monteiro et al., 2020; de Assis et al., 2021).

Previously, we performed an immuno-epidemiological study of the IgG antibody responses in NP from epidemiologically distinct malaria transmission areas of the Atlantic Forest in Brazil (de Assis et al., 2021). Here, the naturally acquired IgM antibody levels of NP against both pre-erythrocytic and erythrocytic stage antigens of *Plasmodium* were evaluated. This can contribute to the understanding of the role of IgM in the immune response against malaria in NP and may allow for the identification of NP species with reservoir capacity.

Materials and methods

Sera from non-human primates and studied areas

Serum samples were collected from NP from three areas of the Atlantic Forest in Southeastern and South Brazil (Table 1

and Figure 1). These areas were previously studied by our group and were shown to have distinct epidemiological profiles of malaria transmission (Costa et al., 2014; de Alvarenga et al., 2018; Nunes et al., 2020; de Assis et al., 2021). Samples from a total of 154 NP belonging to all families (Aotidae, Atelidae, Callitrichidae, Cebidae, and Pitheciidae) from the biological repository of our laboratory were selected for this study (Table 1).

The NP samples that we studied came from three different locations in the Atlantic Forest: Indaial and Joinville, both in the state of Santa Catarina (SC) in south Brazil, and Guapimirim in the state of Rio de Janeiro (RJ) in southeast Brazil (Table 1). Samples from three *Alouatta g. clamitans* from the Fundação de Parques Municipais e Zootônica at Belo Horizonte in the state of Minas Gerais (MG), Brazil, outside the Atlantic Forest in a non-transmission malaria area were used as negative controls.

The first group of samples from Indaial comprised 75 plasma samples all taken from brown howler monkeys (*Alouatta guariba clamitans*) caught between 2008 and 2019: 63 from captive monkeys maintained at the Centre for Biological Research of Indaial (CEPESBI), and a further 12 plasma samples taken from free-living NP. In this group, 81% of samples were from adult NP (Table 1), and *Plasmodium* infection was previously identified by our group in 13% of these NP by PCR (Costa et al., 2014; de Alvarenga et al., 2018). In our previous study, we reported that 75% of these samples were seropositive for IgG responses against pre-erythrocytic stage antigens (CSP peptides) and 90% of them against different erythrocytic stage antigens (PvAMA-1, PvEBP-2, and PvDBPII) of *P. vivax* (de Assis et al., 2021) (Table 1).

The second group of samples was collected in the city of Joinville in an Atlantic Forest conservation area located on private property. These plasma samples were collected from 39 free-living brown howler monkeys between December 2015 and 2017 (for more details about the capture see Nunes et al., 2020). Sampling from adults was prioritized during the captures which made up 85% of the monkeys sampled. *Plasmodium* infection was previously identified in 67% of these selected samples, which were infected with either *P. simium* and/or *P. brasilianum* according to PCR (Nunes et al., 2020). All of these animals showed IgG antibodies against both pre-erythrocytic and erythrocytic stage antigens (de Assis et al., 2021) (Table 1).

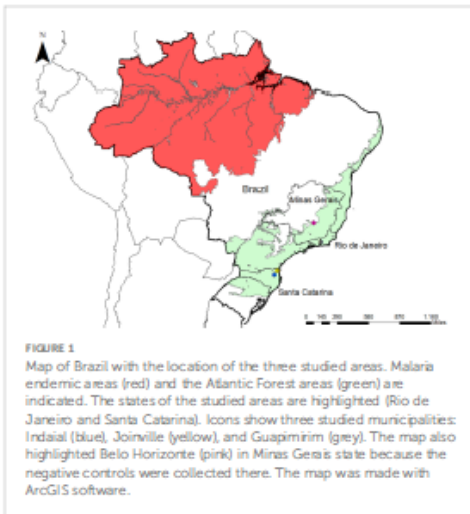
The third group of samples studied came from the Primate Centre of Rio de Janeiro (CPRJ) in Guapimirim, where serum samples were collected between January 2011 and October 2019 from 40 captive adult monkeys belonging to all NP families (Table 1). *Plasmodium* infection was previously identified in 32% of selected samples by PCR (de Alvarenga et al., 2015; Alvarenga et al., 2017). Ninety percent of these animals showed IgG against CSP peptides and 32% against erythrocytic stage antigens (de Assis et al., 2021) (Table 1).

All procedures were performed according to Brazilian guidelines and regulations and were approved by the Fiocruz Research Ethical Committee (CEUA license L037/2016) and by

TABLE 1 Characteristics of the Neotropical primates sampled from each studied area.

Characteristic	Studied area (Municipality/State)			Total
	Indaial/SC	Joinville/SC	Guapimirim/RJ	
	n = 75	n = 39	n = 40	n = 154
Sex ratio male:female	1.27:1	0.95:1	1:1.22	1.05:1
Ratio Adult: Non-adult ^a	4.35:1	5.5:1	4.0:1	6.7:1
Ratio Captive: Free-living	5.25:1	0.39	4.0:1	2.01:1
Families of NP				
Atelidae	75 (100%) ^b	39 (100%) ^b	8 (20%) ^c	122 (79.2%)
Aotidae	0	0	1 (2.5%) ^d	1 (0.6%)
Callitrichidae	0	0	4 (10%) ^e	4 (2.6%)
Cebidae	0	0	24 (60%) ^f	24 (15.6%)
Pitheciidae	0	0	3 (7.5%) ^f	3 (1.9%)
Positivity by PCR^g	10 (13%)	26 (67%)	13 (32%)	59 (32%)
Positivity by EUSA (IgG)^h				
PvCSP	50 (67%)	39 (100%)	34 (85%)	123 (80%)
Pb/PmCSP	47 (63%)	39 (100%)	35 (87.5%)	121 (76%)
PrCSP	54 (72%)	38 (97%)	34 (85%)	126 (82%)
PrAMA-1	52 (69%)	39 (100%)	5 (12.5%)	96 (62%)
PvEBP-2	52 (69%)	39 (100%)	7 (17.5%)	98 (64%)
PvDBPI	48 (64%)	39 (100%)	7 (17.5%)	94 (61%)

Results are expressed in absolute numbers and percentages in parentheses. ^aAge was estimated according to Carpenter, 1965. Studied species of the Neotropical primates: ^b*Alouatta guaribana damiana*, *Alouatta g. clamitans*, *Alouatta caraya*, *Atelopus paniceus*, *Brachyteles arachnoides*; ^c*Aotus nigriceps*; ^d*Mico humeralifer*, *Leontopithecus chrysomelas*, *Leontopithecus rosalia*, *Sapajus oedus*; ^e*Cebus sp.*, *Sapajus robustus*, *Sapajus xanthosternus*; ^f*Cacajao melanocephalus*, *Callitrix personatus*. ^gMolecular diagnosis of *Plasmodium* sp. infection was previously performed by our group (Costa et al., 2014; de Alvarenga et al., 2015; Alvarenga et al., 2017; de Alvarenga et al., 2018; Nunes et al., 2020). ^hEnzyme-linked immunosorbent assay for IgG detection using different antigens of *Plasmodium* was previously performed by our group (de Assis et al., 2021). SC – state of Santa Catarina; RJ – state of Rio de Janeiro.



the Brazilian Ministry of Environment (SISBIO numbers 43375-4, 43375-6, 54707-137362-2, 52472-1, and 28953-1).

Peptides and recombinant *Plasmodium* antigens

Pre-erythrocytic stage antigens

Synthetic peptides corresponding to the repeated immunodominant epitope of the major pre-erythrocytic stage antigen, named the Circumsporozoite Protein (CSP), were used for the detection of immunoglobulin M (IgM) antibodies. Three variants of *P. vivax* CSP (PvCSP) were used: the classic VK210 (Pvc) DGQPAGDRAAGQPAG-(DRADGQPAG)₂, VK247 (Pvk) (ANGAGNQPAG)₃-ANGAGN, and *P. vivax*-like (Pvl) (APGANQEGGAA)₃. Additionally, CSP peptides from *P. falciparum* (NANP)₃ (PrCSP) and *P. malariae*/*P. brasilianum* (GNAA)₂-GNDA(GNAA)₄ were utilized. The CSP repeat sequences of *P. brasilianum* and *P. malariae* are identical, and because of that, they were referred to as Pb/PmCSP (Guimarães et al., 2012; Pereira et al., 2018).

Plasmodium spp. erythrocytic stage antigens

As previously described, the following erythrocytic stage antigens were produced as recombinant proteins. Recombinant DBP-II proteins included amino acids 243–573 of Duffy Binding Protein (DBP) from the Sal-1 reference strain, and recombinant EBP2 included amino acids 159–485 of the Erythrocyte Binding Protein 2 from C127 Cambodian isolate. These two recombinant proteins were expressed as 39 kDa 6xHis-tag fusion protein in *Escherichia coli* (Fang et al., 1991; Cerávolo et al., 2005; Ntumngia et al., 2012; Ntumngia and Adams, 2012; Ntumngia et al., 2016). The ectodomain of *P. vivax* apical Membrane Antigen 1 (PvAMA-1), including aminoacids 43 to 487, was produced as a recombinant protein with 6xHis-tag in the eukaryotic expression system (Cunha et al., 2014; Vicentin et al., 2014). The Merozoite Surface Protein-1 protein was additionally used to better characterize the NP responses based on previous studies that indicated that it is highly immunogenic under natural conditions of human exposure (Soares et al., 1997; Riccio et al., 2013; Uplekar et al., 2017; Kale et al., 2019). The 19-kDa C-terminal fragment of the MSP-1 from *P. vivax*, *P. falciparum*, and *P. malariae* (MSP1-19), which represents amino acids 1616–1704, was expressed as a 6xHis tag fusion protein in *Pichia pastoris* (Soares and Rodrigues, 2002).

Immunoglobulin M detection assay

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Plasmodium* antigens was performed, as previously described (Duarte et al., 2006; Pereira et al., 2018; de Assis et al., 2021) with modifications. Briefly, all CSP synthetic peptides were used at 10 µg/mL to coat the plates, while recombinant proteins were used at a final concentration of 1 µg/mL (PvMSP1₁₉), 1.5 µg/mL (PvEBP-2 and PvAMA-1), 3 µg/mL (PvDBP-II), and 5 µg/mL (PmMSP1₁₉ and PmMSP1₁₉). NP serum or plasma samples were diluted at 1:50. Anti-human IgM-peroxidase-conjugated antibody (Jackson ImmunoResearch) was used as a secondary antibody at 1:2500 dilution for CSP peptides or 1:5000 for recombinant proteins. In each well was added 100 µL of the 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) single solution (Life Technologies). Reaction development was interrupted by adding 25 µL of 2N HCl in each well. Antibodies were detected using a microplate reader (Spectra Max 340PC384, Molecular Devices) at an optical density (OD) of 450 nm. Results were expressed as seroprevalence, i.e., the percentage of positives, and antibody levels were expressed as the reactivity index (RI), which was calculated by dividing the mean OD values of tested samples by the mean plus three standard deviations (SDs) of the negative control samples. Samples used as negatives were taken from three *Alouatta g. clamitans* from Belo Horizonte in the state of Minas Gerais, Brazil, a non-transmission malaria area. This species was selected as it corresponded to 77% of the non-control animals studied here. These samples were negative in the *Plasmodium* PCR protocols tested (Snounou et al., 1993; de Alvarenga et al., 2018). Samples with an RI greater than one were considered positive. For comparisons with immune responses against erythrocytic stage antigens, samples were considered positive for PvCSP when they showed an RI >1 for any of the three CSP repeats (VK210, VK247, or *P. vivax*-like).

Statistical analysis

Analyses were done using GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and R version 4.0.2 (Vienna, Austria) (R Core Team, 2020). For each area of study, the distribution of the data for each of the parameters was determined by the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. Differences in the proportion of the seropositive were evaluated using either Fisher's exact test or the Chi-square test (χ^2), according to the data distribution. The differences between either the medians or means of the reactivity index (RI) of two groups were verified using either the *t*-test or the Mann-Whitney *U* test, respectively, according to the data distribution. The RI comparisons between more than two groups were performed using either Analysis of Variance (ANOVA) or the Kruskal-Wallis test, followed by Tukey's or Dunn's post-hoc tests, respectively, according to the data distribution. For analysis of the overall data set, i.e., the data from all three groups combined, the association between categorical variables (age, sex, whether free-living or captive, and the occurrence of active infection – as determined by PCR) and seroprevalence and IgM titers was assessed using either the Chi-square test (χ^2) or Fisher's exact test, and the *t*-test or Mann-Whitney *U* test, respectively. Heatmaps for antibody levels against *Plasmodium* antigens were created using the R package *ComplexHeatmap*, which showed the hierarchical clustering with families fixed (Gu et al., 2016). The intersections of responders to PvCSP and *P. vivax* erythrocytic stage antigens were plotted using the "UpSetR" R package (v1.4.0) (Conway et al., 2017). Analyses of correlation between antibody levels of responders (i.e., those individuals classified as seropositive) were assessed using Spearman's rank correlation coefficient. For analyses of the categorical variables described above, the odds ratios for individuals to have antibodies against given antigens of the various *Plasmodium* spp. tested, generalized linear models (Gamma regression model and logistic regression), and the Gamma-binomial mixture model were used. Variables with *P*-values < 0.20 in the likelihood ratio test went on to step 2, where all were jointly adjusted. From that moment on, all the variables that passed from the previous step were adjusted together. The significance of each was analyzed separately using the likelihood ratio test. Here, we compared whether there was a significant difference between the model without and with the variable in question. A model was fitted with all significant variables from the previous step. The process was repeated until only significant variables remained. In all analyses, a significance level of 5% was considered, i.e., values of *P* < 0.05.

Results

IgM responses against pre-erythrocytic stage CSP peptides

Overall, 59% (91/154) of the NP showed an IgM response against at least one of the five CSP peptides assayed (Supplementary Figure 1A). The responses against at least one of the PvCSP peptides

(Pvc, Pvk, and Pvl) ranged from 37% (Guapimirim/SC) to 87% (Joinville/SC). Twenty-seven percent (Indaial/SC) and up to 97% (Joinville/SC) of the NP also showed IgM responses against PfCSP. From 10% (Guapimirim/RJ) to 41% (Joinville/SC) showed IgM antibodies against Pb/PmCSP (Figure 2A top). The frequency of seropositive NP was significantly highest against PfCSP and *P. vivax* "classic" VK210 (Pvc) in all three areas ($P < 0.05$) (Figure 2A top).

In Indaial/SC, antibody levels were significantly higher against Pvc and Pvl than against the Pvk peptide ($P < 0.05$). In Joinville/SC, antibody levels were significantly higher against PfCSP than against PvkCSP, PvlCSP, and Pb/PmCSP peptides ($P < 0.05$). The levels of antibodies were relatively low and without any statistically significant differences among all CSP peptides in Guapimirim/RJ (Figure 2A bottom).

IgM responses against *Plasmodium vivax* erythrocytic stage antigens

Overall, significant levels of IgM were identified in 87% (134/154) of the NP studied against at least one of the three *P. vivax* erythrocytic stage antigens assayed (PvAMA-1, PvEBP-2, and PvDBPII) (Supplementary Figure 1B). The seroprevalence for at least one of the three erythrocytic stage antigens was higher for Joinville/SC and Guapimirim/RJ (both 95%) than Indaial/SC (76%). The frequency of positive NP was significantly higher against PvEBP-2 than against the other antigens only in Guapimirim/RJ ($P < 0.05$) (Figure 2B top). Antibody titers against PvAMA-1 were higher than PvDBPII in all three of the areas studied. In Guapimirim/RJ, the levels of anti-PvAMA-1 IgM were also significantly higher than against PvEBP-2 ($P < 0.05$) (Figure 2B bottom).

Association between the seroprevalence and antibody levels against PvCSP and erythrocytic stage antigens of *P. vivax*

Thirty-seven percent (50/135) of the NP showed IgM antibodies against all of the studied antigens (i.e., all three pre-erythrocytic and all three erythrocytic stage antigens from *P. vivax*), while 45% (61/135) of the NP showed IgM against all three variants of PvCSP and at least one erythrocytic stage antigen (either PvAMA-1, PvEBP-2, and/or PvDBPII), and 53% (71/135) of the individuals showed IgM against at least one erythrocytic stage antigen but not against CSP (Figure 3A). Significant positive correlations ranging from moderate to strong were identified ($P < 0.001$) between antibody levels against PvCSP and PvAMA-1 ($\rho = 0.55$), PvCSP and PvEBP-2 ($\rho = 0.48$), PvCSP and PvDBPII ($\rho = 0.55$), PvAMA-1 and PvEBP-2 ($\rho = 0.72$), PvAMA-1 and PvDBPII ($\rho = 0.68$), and PvEBP-2 and PvDBPII ($\rho = 0.74$) (Figure 3B). These comparisons were also performed when classifying the NP according to PCR positivity for malaria infection; however, the previously described significant correlations were not altered according to this parameter (data not shown).

Variables potentially associated with seroprevalence and IgM levels against CSP and erythrocytic stage antigens

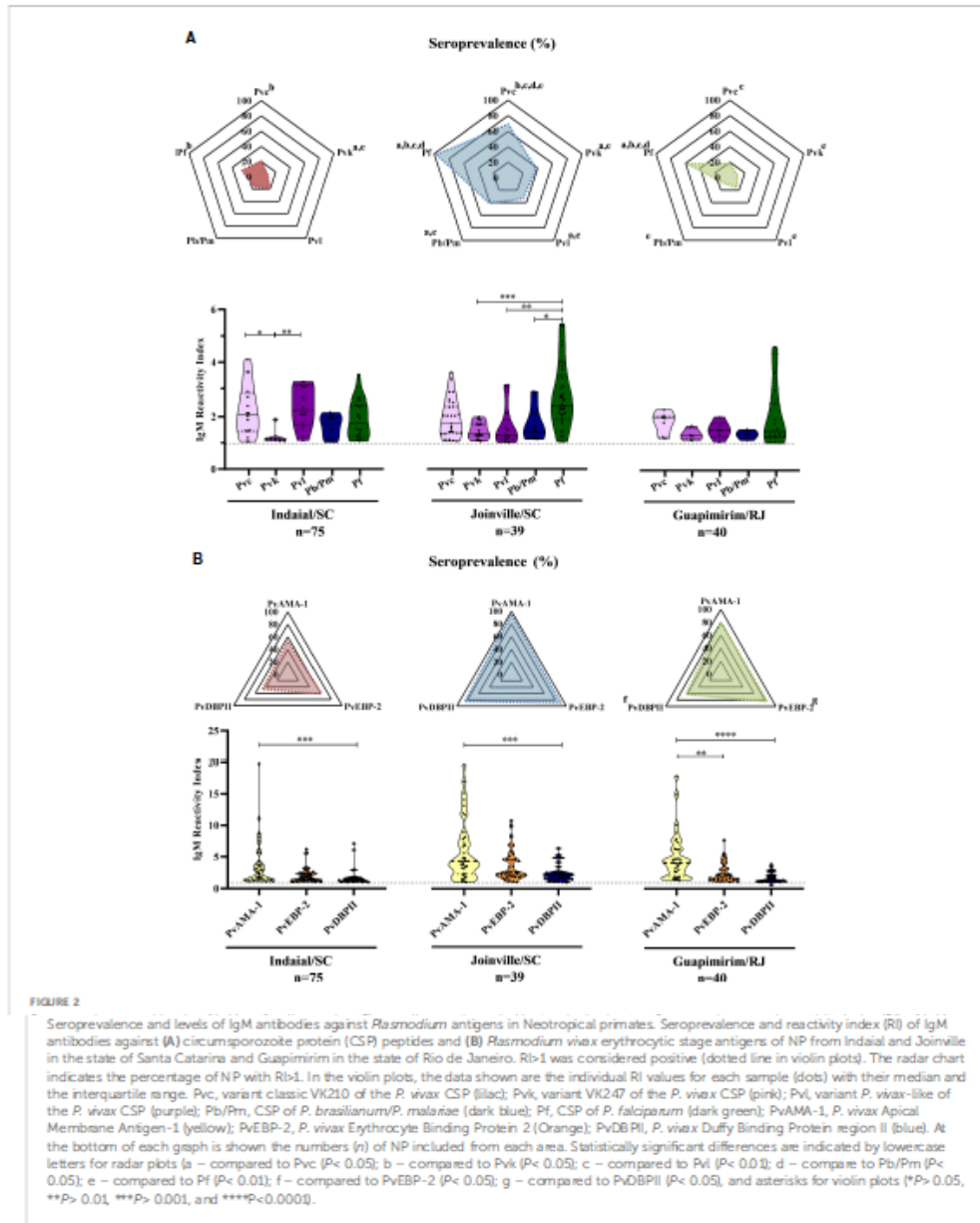
Free-living NP showed both significantly higher IgM titers against PvCSP and a higher seroprevalence against Pb/PmCSP and PfCSP when compared to captive animals ($P < 0.05$) (Figure 4A). All comparisons of free-living and captive NP are shown in Supplementary Figure 2. Adult animals also had significantly higher seroprevalence against PvEBP-2 than non-adults NP ($P < 0.05$) (Figure 4B and Supplementary Figure 3). Seroprevalences and IgM titers were similar between the sexes for the CSP peptides and erythrocytic stage antigens ($P > 0.05$) (Supplementary Figure 4).

Among NP PCR-positive for *P. brasiliense*/*P. malariae*, the seroprevalence against Pb/PmCSP was higher than in PCR-negative monkeys for this infection (seroprevalences: 36% and 18%, respectively, $P > 0.05$), while IgM titers were similar (Figure 4A and Supplementary Figure 5). Frequencies of seropositivity against PvCSP, PvAMA-1, and PvDBPII were higher in NP infected with *P. simium* (PCR-positive for this malaria parasite) compared to NP non-infected with *P. simium* (PCR-negative for *P. simium*) ($P < 0.05$, Chi-square test) (Figure 4). NP PCR-positive for *P. simium* also showed higher levels of IgM against the PvEBP-2 and PvDBPII than PCR-negative individuals ($P > 0.05$) (Figure 4 and Supplementary Figure 5).

Generalized linear models and the identification of factors associated with IgM response against *Plasmodium* spp. antigens

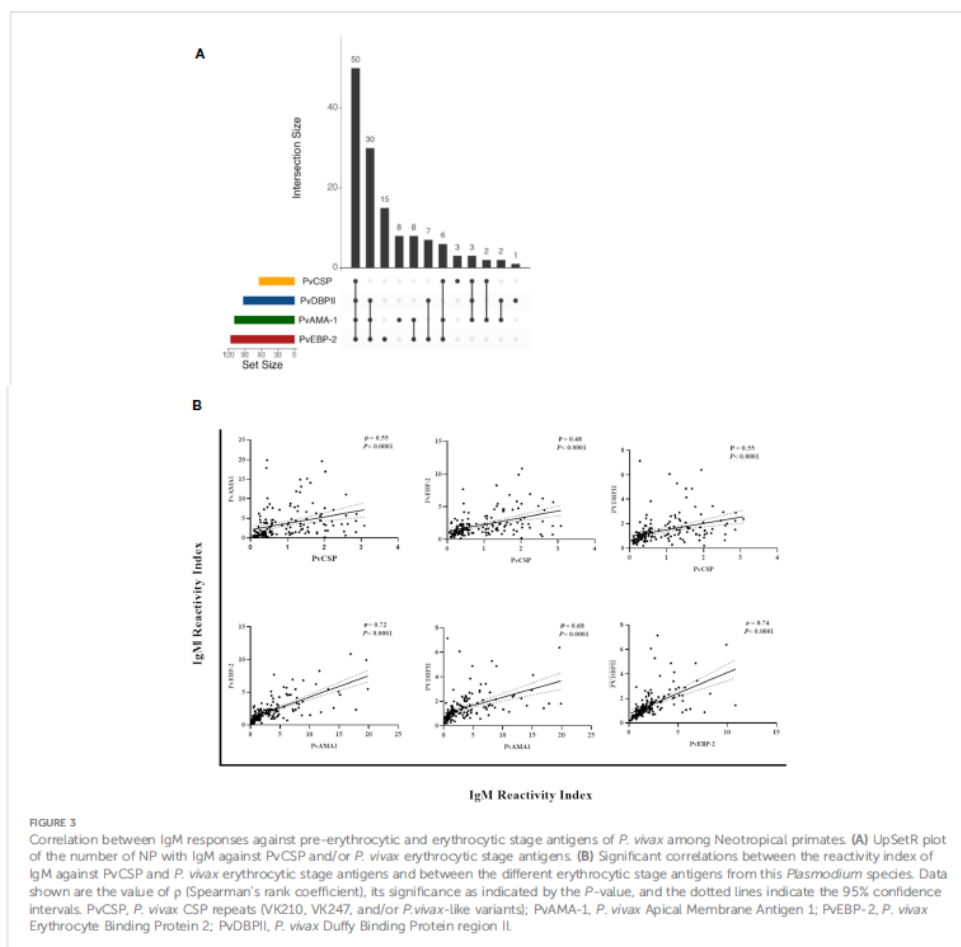
In order to identify which variables could explain the occurrence of IgM antibodies against *Plasmodium* spp., generalized linear models (gamma regression model, logistic regression, and the Gamma-binomial mixture model) were used. With respect to the response against the pre-erythrocytic stage protein, CSP, individuals that were PCR-positive for malaria infection showed a higher chance of having IgM antibodies against PfCSP, Pb/PmCSP, and PvCSP compared to PCR-negative NP ($P < 0.05$, Logistic Regression) (Figure 5). The highest probability of being seropositive for IgM was observed against PvCSP (3.3 times more likely). Free-living NP also showed a higher chance of having IgM against PfCSP, Pb/PmCSP, and PvCSP. The highest odds ratio for being seropositive with IgM antibodies was observed against PfCSP, which was 11 times more likely. In relation to erythrocytic stage proteins, free-living individuals showed a higher chance of an IgM response against all three antigens. The highest odds ratio was almost five times greater than for captive NP, which was for IgM against PvAMA-1 ($P < 0.008$) (Figure 5).

Individually, a set of variables (PCR-positive and free-living) was identified that determined the chance of NP having IgM against erythrocytic stage proteins. PCR positive (3.66 times, CI = 1.27–10.51



and $P = 0.016$), adult (429 times, CI = 1.39-13.25 and $P = 0.011$), and free-living (4.69 times, CI = 1.61 – 13.64 and $P = 0.004$) individuals were significantly more likely to respond against PvAMA-1 compared to PCR-negative, non-adult, and captive individuals,

respectively ($P < 0.05$). Interestingly, we observed that animals that had IgM against PvCSP and PvAMA-1 were 4.7 times more likely to be PCR-positive, compared to those individuals that did not respond to these proteins ($P < 0.05$) (Supplementary Figure 6).

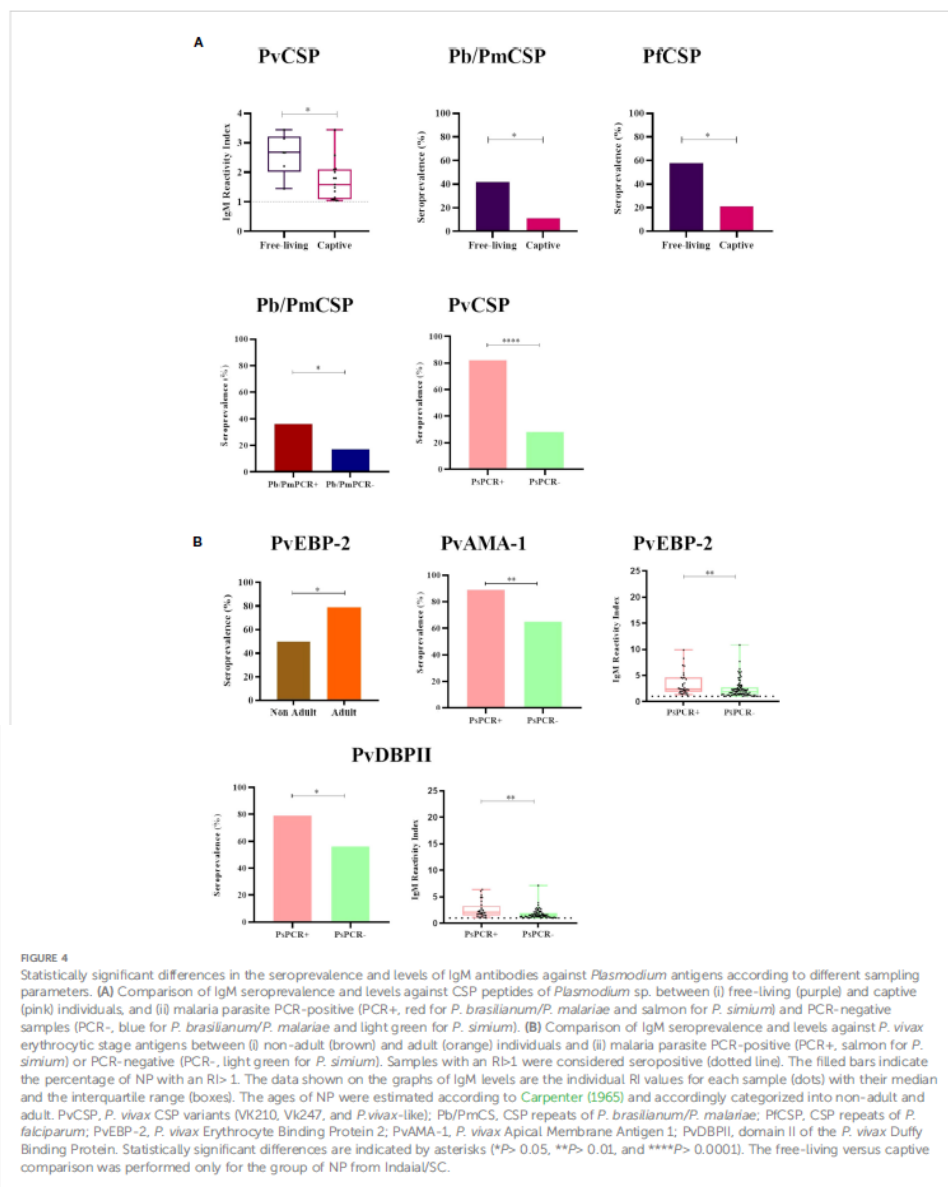


Association between antibody levels against pre-erythrocytic stage peptides and Merozoite Surface Protein 1₁₉ antigens of *Plasmodium* spp.

After observing an association between IgM response and PCR-detectable blood stage infection, the MSP1₁₉ protein was used to further characterize the NP IgM antibody responses. Due to the limited amount of recombinant MSP1₁₉ of *P. vivax*, *P. malariae*, and *P. falciparum* available, the presence of IgM antibodies against these antigens was evaluated only in animals with PCR-detectable *Plasmodium* infection (n=43). Overall, 77% (33/43) of the selected NP samples showed IgM responses against PvMSP1₁₉, with 58% (25/43) having IgM antibodies to all *P. vivax* antigens tested. Twenty-

three percent (10/43) showed IgM antibodies against one or up to three erythrocytic stage antigens, and 2% (1/43) did not respond against any of the studied antigens. Seroprevalence and antibody titers against PvMSP1₁₉ and the other erythrocytic stage *P. vivax* antigens studied were similar. However, there was a statistically significant difference only between PvMSP1₁₉ and PvCSP ($P < 0.05$). A significantly weak to moderate positive correlation was also identified between antibody levels against PvMSP1₁₉ and other antigens ($P < 0.003$) (Figure 6A).

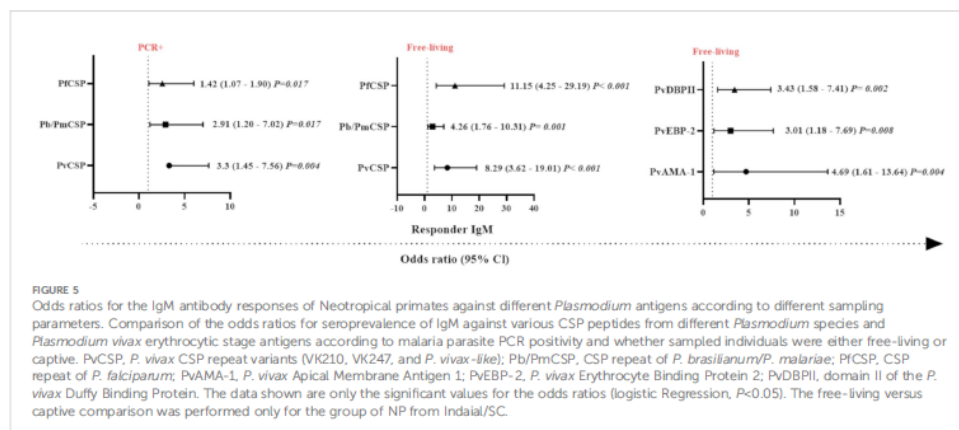
Ninety-three percent of individuals (40/43) showed IgM against PmMSP1₁₉, 35% (15/43) showed IgM against Pb/PmCSP and PmMSP1₁₉, and 5% (2/43) did not respond against any Pb/Pm antigen. The frequency of responders and their level of antibody against PmMSP1₁₉ were higher than against Pb/PmCSP ($P < 0.001$).



No correlation was observed between IgM levels against both Pb/Pm antigens (Figure 6B).

Sixty percent (26/43) of NP showed IgM against PfMSP1₁₉, 50% (22/43) showed IgM against the PfCSP and PfMSP1₁₉, and 16% (7/43)

did not respond against any one of these antigens. Seroprevalences and antibody titers were similar against both of these antigens ($P > 0.05$). A significant weak positive correlation was identified between antibody levels against PfCSP and PfMSP1₁₉ ($\rho = 0.33$ and $P = 0.027$) (Figure 6C).



IgM responses against *Plasmodium* spp. antigens among Neotropical primate families

The analyses of IgM responses among different NP families were performed using samples only from Guapimirim/RJ because the other areas had species only from the Atelidae family (Table 1). A unique specimen from the Aotidae family showed low ($RI = 1-2$) or medium ($2 < RI < 4$) levels of IgM antibodies against the three CSP peptides and against erythrocytic stage antigens. Most animals from the Atelidae family had medium to high ($RI \geq 4$) levels of antibodies against erythrocytic stage antigens. Sixty-two percent of NP in this family also showed IgM against at least one of the three CSP peptides (Pv, Pb/Pm, and Pf), and 100% showed antibodies against at least one erythrocytic stage antigens (Figure 7). Seventy-five percent of NP from the Callitrichidae family had low to medium levels of antibodies against all three CSP peptides, and all individuals from this family showed medium to high levels of antibodies against erythrocytic stage antigens (Figure 7). A similar response profile was observed for the animals of the Cebidae family, with 58% of individuals showing low levels of antibodies against at least one CSP peptide, and 92% of NP from this family having IgM against at least one of the erythrocytic stage antigens. All specimens of the Pitheciidae family had low to medium levels of IgM against, at least, one CSP peptide and one erythrocytic stage antigen, generally at high levels (Figure 7).

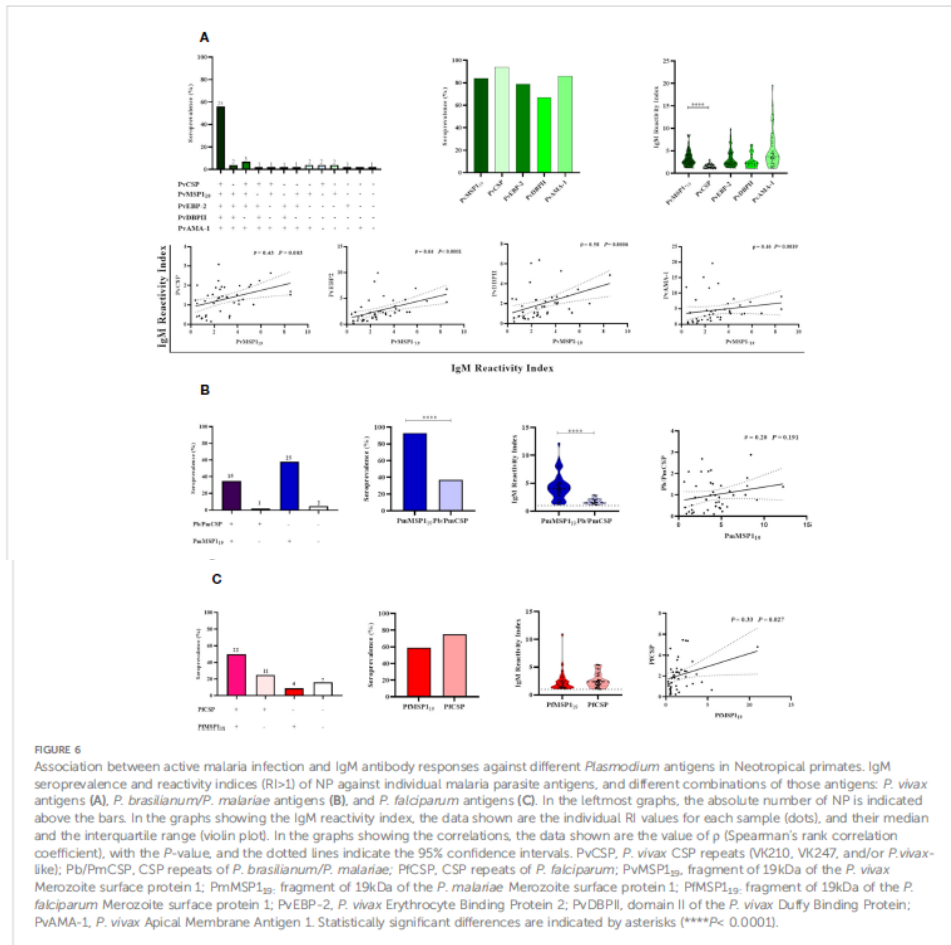
Discussion

In this study, the profile of acquired IgM antibody immune responses against both pre-erythrocytic and erythrocytic stage antigens of *Plasmodium* was evaluated in NP from different Atlantic Forest areas of Brazil for the first time. The presence of IgM against the major pre-erythrocytic stage antigen (CSP) was

used here as a potential marker of exposure to infected mosquito bites.

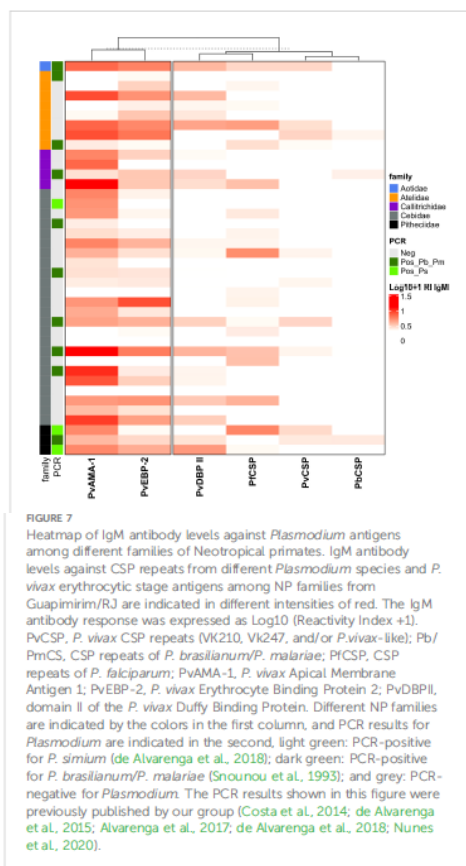
The frequency of NP showing IgM against CSP peptides was highly variable among the different CSP peptides of different *Plasmodium* species, and the geographic areas were tested (ranging from 10% to 97%). Conversely, the IgM responses were very high for every erythrocytic stage antigen in all studied areas. IgM antibody levels were higher against the PvCSP variant VK210, which is the most common *P. vivax* CSP variant in humans, and NP, which is one of the two variants described for *P. simium* (Goldman et al., 1993; Oliveira-Ferreira et al., 2004; Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011; Santos et al., 2019; de Assis et al., 2021). Similar to the IgM response against Pb/PmCSP identified here, IgG antibodies against this peptide were also previously detected among NP from the Atlantic Forest in Brazil by our group and others (Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011; de Assis et al., 2021). The high frequency of NP displaying IgM antibodies against the *P. falciparum* CSP, as observed here, also paralleled the previously reported IgG response against this protein in these animals and other NP from different Brazilian states (Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011; de Assis et al., 2021). The positive correlation observed in IgM levels against all the studied antigens for each *Plasmodium* species suggests that there is cross-reactivity in the immune response against CSP of different *Plasmodium* species, as previously demonstrated (Hope et al., 1984; Hall et al., 2019).

Free-living animals showed a higher frequency of IgM antibodies against Pb/PmCSP and PFCSP and higher levels of IgM against PvCSP compared to captive animals. These findings may be due to the closer proximity between free-living animals and infected mosquitoes. Similar results were previously observed by our group for IgG antibodies in the same individuals (de Assis et al., 2021). Overall, these data suggest that the seroprevalences of IgM and IgG for *Plasmodium* CSP are good markers of exposure to the transmission of malaria.



Additionally, the detection of antibodies against erythrocytic stage *Plasmodium* antigens was evaluated to characterize immune responses in individuals with established blood-stage *Plasmodium* infections. Recombinant proteins of *P. vivax* blood-stage surface proteins, which are involved in parasite-host interactions and are leading vaccine candidates, were used to evaluate the IgM response of NP from the Atlantic Forest due to the similarity between *P. vivax* and *P. simium*. Here, the highest IgM antibody levels were observed against PvAMA-1 in three studied areas, and high seroprevalences against PvAMA-1 and PvEBP-2 were also detected in some areas. This is the first study to evaluate IgM antibodies against PvEBP-2 in non-human primates. Recently, PvEBP-2 has been suggested as a novel ligand for a potential alternative invasion pathway of Duffy-

positive reticulocytes (Hester et al., 2013; Ntumngia et al., 2016). A high seroprevalence of anti-PvEBP-2 IgG was shown in humans from Papua New Guinea, and also for the same NP individuals in our previous study (França et al., 2017; He et al., 2019; de Assis et al., 2021). An IgM response against PvAMA-1 was also previously shown in human individuals recently exposed to *P. vivax* malaria in Brazil (rate of 48.5% responders) (Rodrigues et al., 2005). The low frequency of IgM against PvDBPII was shown here in all three of the studied areas. Medeiros et al. detected anti-PvDBPII IgM in approximately 40% of long-term *P. vivax*-exposed humans in the Amazon (Medeiros et al., 2020). The low immunogenicity of DBPII might be due to the fact that this antigen is only exposed by the merozoite at the time of the reticulocyte invasion, resulting in a short time of



contact with the immune system of the host (Adams et al., 1990). IgG antibodies against PvAMA-1 and PvDBP II were previously detected by our group in the same NP individuals studied here (Costa et al., 2014; de Assis et al., 2021).

Furthermore, in order to better characterize the IgM response of NP with established PCR-detectable malaria infection, we used highly immunogenic antigens, the well-characterized MSP1₁₉ of *P. vivax*, *P. falciparum*, and *P. malariae* (Soares et al., 1997; Riccio et al., 2013; Uplekar et al., 2017; Kale et al., 2019). A high seroprevalence was observed for both PmMSP1₁₉ and PvMSP1₁₉, and antibody levels were higher for these antigens compared to the other antigens from the same *Plasmodium* species. These findings confirm the high immunogenicity of MSP1₁₉, which is already well-known for humans (Soares et al., 1997; Riccio et al., 2013; Pires et al., 2018; Kale et al., 2019), and NP in areas with circulation of both *P. simium* and *P. brasilianum/P. malariae* of the Atlantic Forest (Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011; Monteiro et al., 2020). A high seroprevalence of IgG against PvMSP1₁₉ was also reported in

NP from the Atlantic Forest in the states of São Paulo and Santa Catarina (Yamasaki et al., 2011; Costa et al., 2014; Monteiro et al., 2020). Overall, these findings corroborate the hypothesis of high circulation of *Plasmodium* spp. between NP in the Atlantic Forest in Brazil (Deane, 1992; de Pina-Costa et al., 2014; Brasil et al., 2017). The significant positive correlations between the IgM responses against pre-erythrocytic and erythrocytic stage antigens found here have also been described in human and non-human primates (França et al., 2017; He et al., 2019; de Assis et al., 2021).

IgM antibodies against PfMSP1₁₉ had a lower frequency of responders (60%) compared to MSP1₁₉ specific for other *Plasmodium* species, while antibody levels were similar to other Pf antigens (PfCSP). A similar frequency of individuals showing IgG against PfMSP1₁₉ (approximately 50%) was reported in human populations in the Amazon region (Braga et al., 2002; Ladeira-Andrade et al., 2007). The IgG seroprevalence against *P. falciparum* antigens in NP and humans and *P. falciparum* infection in humans and mosquitoes have been described in the Atlantic Forest areas of other states in Brazil (Duarte et al., 2006; Cerutti et al., 2007; Marrelli et al., 2007; Yamasaki et al., 2011; Maselli et al., 2014; Laporta et al., 2015; Monteiro et al., 2020). However, NP infection by this species of *Plasmodium* has only been rarely reported in the Atlantic Forest areas (Duarte et al., 2008; Bueno, 2012). Moreover, these findings reinforce the need to investigate the circulation of this *Plasmodium* species or *P. falciparum*-like parasites in this area (Sallum et al., 2014).

Adult NP showed a higher seroprevalence against PvEBP-2 than non-adult animals, suggesting that the IgM response depends on repetitive cycles of erythrocytic stage infection. A primary *P. vivax* infection was not sufficient to induce significant IgM and IgG antibodies to EBP-2 in individuals of a malaria outbreak in the state of Minas Gerais state in Brazil, which is a non-endemic area of malaria transmission (Lima et al., 2022). IgG responses against different erythrocytic stage antigens increase with age due to repeated exposure to *Plasmodium* sp., mainly occurring only in endemic areas (Kano et al., 2012; Griffin et al., 2015; Stanisic et al., 2015; França et al., 2016; França et al., 2017; He et al., 2019; Kale et al., 2019). Longley et al. suggest the use of antibodies against PvEBP-2 as a possible serological marker to detect recent infection by *P. vivax* (Longley et al., 2020). This data reinforces the notion that NP is constantly exposed to malaria transmission in the Atlantic Forest in Brazil.

Plasmodium simium-infected NP had a high seroprevalence of IgM against PvCSP, PvAMA-1, and PvDBP II, as well as high levels of IgM antibodies against PvEBP-2 and PvDBP II. A positive correlation was previously reported for antibody responses (either IgM or IgG) against PvAMA-1 and malaria positivity (Rodrigues et al., 2005; Kale et al., 2019). The absence of a correlation between anti-PvDBP II and PvEBP-2 IgM in acute malaria infections was observed in humans from the Amazon and areas outside the Amazon areas (Medeiros et al., 2020; Lima et al., 2022). Significant differences were not observed in either the seroprevalence or the levels of IgM between the different sexes of NP. In general, there are no great differences in the behavior of male and female brown howler monkeys in the wild, such as mobility, which would imply that both have the same exposure to malaria parasites (Crockett and Eisenberg, 1987; Neville et al., 1988; Rudran and Fernandez-Duque, 2003).

Overall, here, we observed a high frequency of NP from each taxonomic family responding to CSP peptides, but most of them showed only low levels of antibodies. Conversely, almost all animals showed IgM against the studied erythrocytic stage antigens, many with high levels, regardless of their taxonomic family. Previous studies have shown the presence of IgG antibodies against CSP and different erythrocytic stage antigens of *P. vivax*, *P. malariae*/*P. brasilianum*, and *P. falciparum* mainly in *Alouatta guariba clamitans* of the Atelidae family, from the Atlantic Forest areas of the states of São Paulo, Rio de Janeiro, and Santa Catarina (Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011; Costa et al., 2014; Monteiro et al., 2020; de Assis et al., 2021). Our group previously reported IgG antibodies against CSP peptides and erythrocytic stage antigens among NP of the Cebidae and Callitrichidae families from the state of Rio de Janeiro state; however, similar results could not be shown for these NP families from the Atlantic Forest in the states of São Paulo (Duarte et al., 2006; Yamasaki et al., 2011; Monteiro et al., 2020; de Assis et al., 2021). Nevertheless, the IgG profile was the opposite of the IgM profile for these families, with high response against CSP peptides for all families, but high IgG levels for erythrocytic stage antigens mainly for the Atelidae family (de Assis et al., 2021). Overall, the IgM and IgG results suggested that all NP families have similar frequencies of both IgM and IgG, suggesting that all of them have been constantly exposed to infected mosquito bites. However, the intensity of responses (as measured by the reactivity index) shows differences among NP families, with the Atelidae family having the highest levels of anti-CSP IgG, and high IgM and IgG against erythrocytic stage antigens, suggesting that well-established *Plasmodium* infections frequently and mostly occur in this NP family. However, we are aware of the limitations of this conclusion due to the small sample size per family.

Interestingly, generalized linear models allowed us to demonstrate that the major variables (age, sex, free-living NP, and PCR positivity) responsible for the IgM response identified here were the presence of PCR-detectable *Plasmodium* infection and being free-living animals. NP with active infection showed more chances of having IgM against CSP peptides compared to uninfected animals, mainly IgM against PvCSP. No difference was observed in the seroprevalence against CSP in infected and uninfected humans from malaria endemic area (Pereira et al., 2018). Free-living NP also showed a higher chance of having IgM against *Plasmodium* CSP, especially PfCSP. Moreover, free-living animals showed more chances of an IgM response against erythrocytic stage antigens, mainly PvAMA-1, compared to captive animals. PvAMA-1 was highly immunogenic in humans exposed to multiple malaria infections in Brazil and India (Rodrigues et al., 2005; Kale et al., 2019). Overall, these findings suggest that IgM response against PvCSP and PvAMA-1 may be predictors of the potential reservoirs of malaria in the Atlantic Forest. In comparison, free-living NP was more likely to have IgG against both pre-erythrocytic, mainly PvCSP, and erythrocytic stage proteins, mainly PvDBPII (Supplementary Figure 7).

We observed a higher frequency of IgM in NP with PCR-detectable malaria infection compared to uninfected individuals, in addition to an association between IgM response to PvCSP and PvAMA-1 and active infection. This raises the question of whether

the IgM antibodies in these NP were recently acquired or not. Recent studies demonstrate that IgM-expressing memory B cells are expanded in humans living in malaria-endemic areas (Krishnamurthy et al., 2016). Additionally, parasite-specific IgM was recently shown to persist for a long time in patients exposed to *P. vivax* transmission (Patgaonkar et al., 2018; Medeiros et al., 2020). Boyle et al. detected *P. falciparum*-specific IgM antibodies more than 6 months after *Plasmodium* infection in Australians returning from malaria-endemic areas (Boyle et al., 2019). All these findings of long-term IgM responses emphasize the need to better understand the meaning of specific IgM antibodies in malaria infection. In non-human primates, both specific and total IgM antibodies against infected red blood cells (iRBC) were shown to increase and remain elevated during and after the peak of primary infection in the *Plasmodium cynomolgi*-rhesus macaque model (Joyner et al., 2019). Moreover, an inverse association between specific IgM antibodies and parasitemia during relapse has suggested that these antibodies may play a role in neutralizing blood-stage parasites. One limitation of the current study is our focus only on seroepidemiology based on ELISA results, not including functional assays, such as merozoite invasion and cellular lysis. Nonetheless, a follow-up study on IgM in non-human primates naturally-exposed to *Plasmodium* sp. is still required to confirm these findings and evaluate the dynamics of acquisition and persistence of this antibody class.

Our findings suggest that NP from distinct Atlantic Forest areas have had natural exposure to sporozoites and often developed erythrocytic stage infections with different species of *Plasmodium*. For the first time, the humoral IgM immune response was evaluated in naturally infected NP. IgM had significant associations with free-living animals and established malaria infection, mainly for antibodies against PvCSP and PvAMA-1. Thus, the presence of IgM antibodies against these antigens could be used as predictors of NP potentially acting as reservoirs of malaria in the Brazilian Atlantic Forest.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Fiocruz Research Ethical Committee (CEUA license L037/2016) and by the Brazilian Ministry of Environment (SISBIO numbers 43375-4, 43375-6, 54707-137362-2, 52472-1, 28953-1).

Author contributions

CB, LC, and GA designed and conceived the study. GA, DA, AP-C, JJ, GG, AN, AP, SM, HT, VP, and ZH were responsible for sample collection. LT, HC, FK, IS, FN, JA, JF, and LP-R were responsible for the production of *Plasmodium* proteins and

peptides. GA, DA, and LS performed the experiments. ES performed the statistic model. GA, DA, JS-A, TS, FK, LC, LP-R, CD-R, and CB analyzed and interpreted data. GA, DA, and CB wrote the first draft. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq - Grant nos. 457274/2014-0, 310477/2017-4), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG - Grant no. CBB-APQ-02620-15), Fiocruz Inova Grant for innovative products (VPPIS-004-FIO-18-16), and the Secretary for Health Surveillance of the Brazilian Ministry of Health (IOC-017-FIO-17 and IOC-028-FIO-18). This study was partially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. GA was supported by a scholarship from CAPES. CB, LC, CD-R, TS, and IS are supported by a Productivity in Research fellowship from CNPq. CD-R is also supported by Faperj as a "Cientistas do nosso Estado".

Acknowledgments

The authors are grateful for the support from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). The

References

- Abreu, F. V. S., Santos, E. D., Mello, A. R. L., Gomes, L. R., Alvarenga, D. A. M., Gomes, M. Q., et al. (2019). Howler monkeys are the reservoir of malarial parasites causing zoonotic infections in the Atlantic Forest of Rio de Janeiro. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13 (12), e0007906. doi: 10.1371/journal.pntd.0007906
- Adams, J. H., Hudson, D. E., Torii, M., Ward, G. E., Wellem, T. E., Aikawa, M., et al. (1990). The Duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. *Cell* 63 (1), 141-153. doi: 10.1016/0092-8674(90)90295-p
- Alvarenga, D. A., Pina-Costa, A., Bianco, C., Moreira, S. B., Brasil, P., Pissinatti, A., et al. (2017). New potential *Plasmodium brasiliense* hosts: tamarin and marmoset monkeys (family Callitrichidae). *Malar J.* 16 (1), 71. doi: 10.1186/s12936-017-1724-0
- Barnwell, J. E. (1986). Antigens of *Plasmodium vivax* blood stage parasites identified by monoclonal antibodies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81 (Suppl. 2), 56-61. doi: 10.1590/S0074-02761986000600010
- Bohannon, C., Powers, R., Satyabham, L., Cui, A., Tipton, C., Michaeli, M., et al. (2016). Long-lived antigen-induced IgM plasma cells demonstrate somatic mutations and contribute to long-term protection. *Nat. Commun.* 7, 11826. doi: 10.1038/ncomms11826
- Boonyaratnakorn, K., and Taylor, J. J. (2019). Immunoglobulin M, more than just an early responder to malaria. *Immunol. Cell Biol.* 97 (9), 771-773. doi: 10.1111/imcb.12292
- Boyle, M. J., Chan, J. A., Handayani, L., Reiling, L., Feng, G., Hilton, A., et al. (2019). IgM in human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Sci. Adv.* 5 (9), eaax4489. doi: 10.1126/sciadv.aax4489
- Braga, E. M., Barros, R. M., Reis, T. A., Fontes, C. J. F., Moraes, C. G., Martins, M. S., et al. (2002). Association of the IgG response to *Plasmodium falciparum* merozoite protein (C-terminal 19 kD) with clinical immunity to malaria in the Brazilian Amazon region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (5), 461-466. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.461
- Brasil, P., Zalis, M. G., de Pina-Costa, A., Siqueira, A. M., Júnior, C. B., Silva, S., et al. (2017). Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health* 5 (10), 1038-1046. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30333-9

authors also thank Dr. Luke Baton for revising the English and his comments on the manuscript and Aline Naissa Dada from CEPESBI for the logistic support in transporting samples from Indaial/SC to Belo Horizonte/MG.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2023.1169552/full#supplementary-material>

- Bueno, M. G. (2012). Pesquisa de Leishmania spp. e Plasmodium spp. em primatas tropicais provenientes de regiões de Mata Atlântica e Amazônia impactadas por ações antrópicas: investigação *in situ* e *ex situ* [Master's Thesis] [Brazíl (IL)]. Universidade São Paulo, 1-298. doi: 10.11606/T.10.2012.tde-11.10.2012-142919
- Carpenter, C. R. (1965). "The howlers of barro colorado island." in *Primates behavior*. Ed. De Voere (New York: Holt, Rinehart and Winston), 250-291.
- Cassiano, G. C., Furini, A. A., Capobianco, M. P., Storti-Melo, L. M., Almeida, M. E., Barbosa, D. R., et al. (2016). Immunogenetic markers associated with a naturally acquired humoral immune response against an N-terminal antigen of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 (PvMSP-1). *Malar J.* 15, 306. doi: 10.1186/s12936-016-1350-2
- Ceravolo, I. P., Bruña-Romero, O., Braga, E. M., Fontes, C. J., Brito, C. F., Souza, J. M., et al. (2005). Anti-*Plasmodium vivax* Duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72 (6), 675-681. doi: 10.4269/ajtmh.2005.72.675
- Cerutti, C., Boulos, M., Coutinho, A. F., Hatab, M., Falqueto, A., Rezende, H. R., et al. (2007). Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malaria J.* 6, 33. doi: 10.1186/1475-2875-6-33
- Coatney, G. R. (1971). The simian malaria: zoonoses, anthroponoses, or both? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20 (6), 795-803. doi: 10.4269/ajtmh.1971.20.795
- Cochrane, A. H., Barnwell, J. W., Collins, W. E., and Nussenzweig, R. S. (1985). Monoclonal antibodies produced against sporozoites of the human parasite *Plasmodium malariae* abolish infectivity of sporozoites of the simian parasite *Plasmodium brasiliense*. *Infect. Immune.* 50 (1), 58-61. doi: 10.1128/IAI50.1.58-61.1985
- Cohen, S., McGregor, I. A., and Carrington, S. (1961). Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 192, 733-737. doi: 10.1038/192733a0
- Comway, J. R., Lex, A., and Gehlenborg, N. (2017). UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. *Bioinf. (Oxford England)* 33 (18), 2938-2940. doi: 10.1093/bioinformatics/btx364
- Costa, D. C., da Cunha, V. P., de Assis, G. M., de Souza Junior, J. C., Hirano, Z. M., de Arruda, M. E., et al. (2014). *Plasmodium simium/Plasmodium vivax* infections in

- southern brown howler monkeys from the Atlantic Forest. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 109 (5), 641–653. doi: 10.1590/0074-0276130578
- Couper, K. N., Phillips, R. S., Brombacher, F., and Alexander, J. (2005). Parasite-specific IgM plays a significant role in the protective immune response to asexual erythrocytic stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Parasite Immunol.* 27 (5), 171–180. doi: 10.1111/j.1365-3024.2005.00760.x
- Cox-Singh, J. (2012). Zoonotic malaria: *Plasmodium knowlesi*, an emerging pathogen. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25 (5), 530–536. doi: 10.1097/QCO.0b013e31823558780
- Crockett, C. M., and Eisenberg, J. F. (1987). "Howlers: variations in group size and demography," in *Primate societies*. Eds B. B. Smuts, D. L. Cheney, R. M. Seyfarth, R. W. Wrangham and T. T. Struhsaker (Chicago: The University of Chicago Press), 54–68.
- Cunha, M. G., Sibra, E. S., Sepulveda, N., Costa, S. P., Saboia, T. C., Guerreiro, J. F., et al. (2018). Serologically defined variations in malaria endemicity in Para' state, Brazil. *PLoS One* 9 (11), e113357. doi: 10.1371/journal.pone.0113357
- da Fonseca, F. (1951). Plasmódio de primata do Brasil [*Plasmodium* of a primate of Brazil]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 49, 543–553. doi: 10.1590/s0074-02761951000100008
- de Alvarenga, D., Culetton, R., de Pina-Costa, A., Rodrigues, D. F., Bianco, C., Silva, S., et al. (2018). An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. *Sci. Rep.* 8 (1), 86. doi: 10.1038/s41598-017-18216-x
- de Alvarenga, D. A., de Pina-Costa, A., de Sousa, T. N., Pissinatti, A., Zalis, M. G., Suarez-Mutis, M. C., et al. (2015). Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. *Malar. J.* 14, 81. doi: 10.1186/s12936-015-0606-6
- Deane, L. M. (1992). Simian malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 87 Suppl 3, 1–20. doi: 10.1590/s0074-02761992000700001
- de Arruda, M., Nardin, E. H., Nussenzweig, R. S., and Cochrane, A. H. (1989). Sero-epidemiological studies of malaria in Indian tribes and monkeys of the Amazon Basin of Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41 (4), 379–385. doi: 10.4269/ajtmh.1989.41.379
- de Assis, G. M. P., de Alvarenga, D. A. M., Costa Pereira, M. O., Sánchez-Arcila, J. C., de Pina-Costa, A., de Souza Junior, J. C., et al. (2021). Profiling humoral immune response against pre-erythrocytic and erythrocytic antigens of malaria parasites among neotropical primates in the Brazilian Atlantic forest. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 11, doi: 10.3389/fcimb.2021.678996
- de Pina-Costa, A., Brasil, P., Di Santi, S. M., de Araujo, M. P., Suarez-Mutis, M. C., Santelli, A. C., et al. (2014). Malaria in Brazil: what happens outside the amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 109 (5), 618–633. doi: 10.1590/0074-0276140228
- Duarte, A. M., Malafrente, R., dos S., Cerutti, C., Cundo, L., de Paiva, B. R., et al. (2008). Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Tropica* 107 (2), 179–185. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.05.020
- Duarte, A. M., Porto, M. A., Curado, L., Malafrente, R. S., Hoffmann, E. H., de Oliveira, S. G., et al. (2006). Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. *J. Med. Primatol.* 35 (2), 87–96. doi: 10.1111/j.1600-0684.2006.00148.x
- Escalante, A. A., Barrio, E., and Ayala, F. J. (1995). Evolutionary origin of human and primate malaria: evidence from the circumsporozoite protein gene. *Mol. Biol. Evol.* 12 (4), 616–626. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040241
- Fandeur, T., Volney, B., Peneau, C., and de Thoisy, B. (2000). Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum/P. malariae* malaria. *Parasitology* 120 (Pt 1), 11–21. doi: 10.1017/s0031182099005168
- Fang, X. D., Kaslow, D. C., Adams, J. H., and Miller, L. H. (1991). Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 125–132. doi: 10.1016/0166-6851(91)90228-x
- França, C. T., White, M. T., He, W. Q., Hostetler, J. B., Brewster, J., Frato, G., et al. (2017). Identification of highly-protective combinations of *Plasmodium vivax* recombinant proteins for vaccine development. *Elife* 6, e28673. doi: 10.7554/eLife.28673
- França, C. T., He, W. Q., Gruszczyk, J., Lim, N. T., Lin, E., Kiniboro, B., et al. (2016). *Plasmodium vivax* reticulocyte binding proteins are key targets of naturally acquired immunity in young Papua New Guinean children. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (9), e0050114. doi: 10.1371/journal.pntd.0050114
- Goldman, L. F., Qari, S. H., Millet, P. G., Collins, W. E., and Lal, A. A. (1993). Circumsporozoite protein gene of *Plasmodium simium*, a *Plasmodium vivax* like monkey malaria parasite. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57 (1), 177–180. doi: 10.1016/0166-6851(93)90257-x
- Griffin, J. T., Hollingsworth, T. D., Reyburn, H., Drakeley, C. J., Riley, E. M., and Ghani, A. C. (2015). Gradual acquisition of immunity to severe malaria with increasing exposure. *Proc. Biol. Sci.* 282 (1801), 20142657. doi: 10.1098/rspb.2014.2657
- Gu, Z., Eils, R., and Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32 (18), 2847–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btw313
- Guimarães, L. O., Bajaj, M. M., Wunderlich, G., Bueno, M. G., Röhe, F., Catão-Dias, J. L., et al. (2012). The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil. *Acta Trop.* 124 (1), 27–32. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.05.016
- Hall, C. E., Hagan, L. M., Bergmann-Leitner, E., Tosh, D. M., Bennett, J. W., Regules, J. A., et al. (2019). Mosquito Bite-Induced Controlled Human Malaria Infection With *Plasmodium vivax* or *P. falciparum* Generates Immune Responses to Homologous and Heterologous Preerythrocytic and Erythrocytic Antigens. *Infect. Immun.* 87 (3), e00541–e00518. doi: 10.1128/IAI.00541-18
- He, W. Q., Shalri, A. R., Bhandwaj, R., França, C. T., Stanisic, D. L., Healer, J., et al. (2019). Antibody responses to *Plasmodium vivax* Duffy binding and erythrocyte binding proteins predict risk of infection and are associated with protection from clinical malaria. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13 (2), e0006987. doi: 10.1371/journal.pntd.0006987
- Hester, J., Chan, E. R., Menard, D., Mercereau-Puijalon, O., Barnwell, J., Zimmerman, P. A., et al. (2013). *De novo* assembly of a field isolate genome reveals novel *Plasmodium vivax* erythrocyte invasion genes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (12), e2569. doi: 10.1371/journal.pntd.0002569
- Hope, I. A., Hall, R., Simmons, D. L., Hyde, J. E., and Scaife, J. G. (1984). Evidence for immunological cross-reaction between sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature* 308 (5955), 191–194. doi: 10.1038/308191a0
- Joyner, C. J., Brito, C. F. A., Saney, C. L., Joice Cordy, R., Smith, M. L., Lapp, S. A., et al. (2019). Humoral immunity prevents clinical malaria during *Plasmodium* relapses without eliminating gametocytes. *PLoS Pathog.* 15 (9), e1007974. doi: 10.1371/journal.ppat.1007974
- Kale, S., Yadav, C. P., Rao, P. N., Shalini, S., Eapen, A., Srivastava, H. C., et al. (2019). Antibody responses within two leading *Plasmodium vivax* vaccine candidate antigens in three geographically diverse malaria-endemic regions of India. *Malar. J.* 18 (1), 425. doi: 10.1186/s12936-019-3066-6
- Kano, F. S., Sanchez, B. A., Sousa, T. N., Tang, M. L., Saliba, J., Oliveira, F. M., et al. (2012). *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop. Med. Int. Health* 17 (8), 989–1000. doi: 10.1111/j.1365-3113.2012.03016.x
- Krishnamurthy, A. T., Thouvenel, C. D., Portugal, S., Keitany, G. J., Kim, K. S., Holder, A., et al. (2016). Somatic hypermutated *Plasmodium*-specific IgM(+) memory B cells are rapid, plastic, early responders upon malaria rechallenge. *Immunity* 45 (2), 402–414. doi: 10.1016/j.immuni.2016.06.014
- Ladeia-Andrade, S., Ferreira, M. U., Scopel, K. K., Braga, E. M., Bastos M. da, S., Wunderlich, G., et al. (2007). Naturally acquired antibodies to merozoite surface protein (MSP-1(19)) and cumulative exposure to *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in remote populations of the Amazon Basin of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102 (8), 943–951. doi: 10.1590/s0074-02762007000800009
- LaIremuata, A., Magris, M., Vivas-Martinez, S., Koehler, M., Esen, M., Kempaiah, P., et al. (2015). Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: man and monkeys share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine* 2 (9), 1186–1192. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.07.033
- Laporta, G. Z., Burattini, M. N., Levy, D., Fukuya, I. A., de Oliveira, T. M., Maselli, L. M., et al. (2015). *Plasmodium falciparum* in the southeastern Atlantic forest: A challenge to the bromelad-malaria paradigm? *Malar. J.* 14, 181. doi: 10.1186/s12936-015-0680-9
- Lima, B. A. S., Fernandes, G. M., Torres, L. M., Pires, C. V., Alves, J. R. S., Moreira-Nascimento, S. L., et al. (2022). Antibody response to a new member of the DBL family (EBP2) after a brief *Plasmodium vivax* exposure. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 16 (6), e010493. doi: 10.1371/journal.pntd.010493
- Longley, R. J., White, M. T., Takashima, E., Brewster, J., Morita, M., Harbers, M., et al. (2020). Development and validation of serological markers for detecting recent *Plasmodium vivax* infection. *Nat. Med.* 26 (5), 741–749. doi: 10.1038/s41591-020-0841-4
- Lourenço-de-Oliveira, R., and Deane, L. M. (1995). Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon. I—the infection rates of *Plasmodium brasilianum* in non-human primates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90 (3), 331–339. doi: 10.1590/s0074-0276199500300004
- Marrelli, M. T., Malafrente, R. S., Sallum, M. A., and Natal, D. (2007). *Kerteszia* subgenus of anophelids associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. *Malar. J.* 6, 127. doi: 10.1186/1475-2875-6-127
- Maselli, L. M., Levy, D., Laporta, G. Z., Monteiro, A. M., Fukuya, I. A., Ferreira-da-Cruz, M. F., et al. (2014). Detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Subclinical Infection in non-Endemic Region: Implications for Blood Transfusion and Malaria Epidemiology. *Malar. J.* 13, 224. doi: 10.1186/1475-2875-13-224
- Medeiros, C. M. P., Moreira, E. U. M., Pires, C. V., Torres, L. M., Guimarães, L. F. F., Alves, J. R. S., et al. (2020). Dynamics of IgM and IgG responses to the next generation of engineered Duffy binding protein II immunogen: Strain-specific and strain-transcending immune responses over a nine-year period. *PLoS One* 15 (5), e0232786. doi: 10.1371/journal.pone.0232786
- Monteiro, E. F., Fernandez-Becerra, C., Anajo, M., Messias, M. R., Ozaki, I. S., Duarte, A., et al. (2020). Naturally acquired humoral immunity against malaria parasites in non-human primates from the Brazilian Amazon, cerrado and Atlantic forest. *Pathogens* 9 (7), 525. doi: 10.3390/pathogens9070525
- Mourier, T., de Alvarenga, D. A. M., Kaushik, A., de Pina-Costa, A., Douvropoulou, O., Guan, Q., et al. (2021). The genome of the zoonotic malaria parasite *Plasmodium simium* reveals adaptations to host switching. *BMC Biol.* 19 (1), 219. doi: 10.1186/s12915-021-01139-5
- Neville, M. K., Glander, K. E., Braza, F., and Rylands, A. B. (1988). *The howling monkeys, genus Alouatta, in Ecology and Behavior of Neotropical Primates* 2. Eds. R. A. Mittermeier, A. B. Rylands, A. F. Coimbra Filho and G. A. B. Fonseca (Washington, D.C.: World Wildlife Fund), 349–453.

- Ntumngia, F. B., and Adams, J. H. (2012). Design and immunogenicity of a novel synthetic antigen based on the ligand domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 30–36. doi: 10.1128/CVI.05466-11
- Ntumngia, F. B., Schloegel, J., Barnes, S. J., McHenry, A. M., Singh, S., King, C. L., et al. (2012). Conserved and variant epitopes of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein as targets of inhibitory monoclonal antibodies. *Infect. Immunol.* 80, 1203–1208. doi: 10.1128/IAI.05924-11
- Ntumngia, F. B., Thomson-Luque, R., Torres, L., Gunalan, K., Carvalho, L. H., and Adams, J. H. (2016). A novel erythrocyte binding protein of *Plasmodium vivax* suggests an alternate invasion pathway into Duffy-positive reticulocytes. *mBio* 7 (4), e01261–e01216. doi: 10.1128/mBio.01261-16
- Nunes, A., Alvarenga, D., de Souza Junior, J. C., Peruchi, A. R., Gonçalves, G., Hirano, Z., et al. (2020). *Plasmodium* infection and its association with biochemical and haematological parameters in free-living Alouatta guariba clamitans (Cabrera 1940) (Primates: atelidae) in southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 114, e190210. doi: 10.1590/0074-02760190210
- Oliveira, T. R., Fernandez-Becerra, C., Jimenez, M. C., Del Portillo, H. A., and Soares, I. S. (2006). Evaluation of the acquired immune responses to *Plasmodium vivax* VIR variant antigens in individuals living in malaria-endemic areas of Brazil. *Malaria J.* 5, 83. doi: 10.1186/1475-2875-5-83
- Oliveira-Ferreira, J., Pratt-Riccio, L. R., Arruda, M., Santos, F., Daniel Ribeiro, C. T., Goldberg, A. C., et al. (2004). HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of P. Vivax (VK210, VK247 and P. VivaxLike) in individuals naturally exposed to malaria. *Acta Trop.* 92 (1), 63–69. doi: 10.1016/j.actatropica.2004.02.011
- Patgaonkar, M., Herbert, F., Powale, K., Gandhe, P., Gogtay, N., Thatte, U., et al. (2018). Vivax infection alters peripheral B-cell profile and induces persistent serum IgM. *Parasite Immunol.* 40 (10), e12580. doi: 10.1111/pim.12580
- Pereira, V. A., Sánchez-Arcila, J. C., Vasconcelos, M., Ferreira, A. R., de Souza Videira, L., Teva, A., et al. (2018). Evaluating seroprevalence to circumsporozoite protein to estimate exposure to three species of *Plasmodium* in the Brazilian Amazon. *Infect. Dis. Poverty.* 7 (1), 46. doi: 10.1186/s10249-018-0428-1
- Pires, C. V., Alves, J., Lima, B., Paula, R. B., Costa, H. L., Torres, I. M., et al. (2018). Blood-stage *Plasmodium vivax* antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. *PLoS One* 13 (11), e0207244. doi: 10.1371/journal.pone.0207244
- Pleass, R. J., Moore, S. C., Stevenson, L., and Hviid, L. (2016). Immunoglobulin M: restrainer of inflammation and mediator of immune evasion by *Plasmodium falciparum* malaria. *Trends parasitology.* 32 (2), 108–119. doi: 10.1016/j.pt.2015.09.007
- R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. In (Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing). Available at: <http://www.r-project.org/index.html> (Accessed February 8, 2023).
- Riccio, E. K., Totino, P. R., Pratt-Riccio, L. R., Ennes-Vidal, V., Soares, I. S., Rodrigues, M. M., et al. (2013). Cellular and humoral immune responses against the *Plasmodium vivax* MSP-1₁₉ malaria vaccine candidate in individuals living in an endemic area in north-eastern Amazon region of Brazil. *Malaria J.* 12, 326. doi: 10.1186/1475-2875-12-326
- Rodrigues, M. H., Rodrigues, K. M., Oliveira, T. R., Cómodo, A. N., Rodrigues, M. M., Kocken, C. H., et al. (2005). Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int. J. Parasitol.* 35 (2), 185–192. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.11.003
- Rudran, R., and Fernandez-Duque, E. (2003). Demographic changes over thirty years in a red howler population in Venezuela. *Int. J. Primatol.* 24, 925–947. doi: 10.1023/A:1026241625910
- Sabchareon, A., Burnouf, T., Ouattara, D., Attanath, P., Bouharoun-Tayoun, H., Chantavanich, P., et al. (1991). Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hygiene* 45 (3), 297–308. doi: 10.4269/ajtmh.1991.45.297
- Sallum, M. A., Daniel-Ribeiro, C. T., Laporta, G. Z., Ferreira-da-Cruz, M., Maselli, I. M., Levy, D., et al. (2014). Finding connections in the unexpected detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in asymptomatic blood donors: a fact in the Atlantic Forest. *Malaria J.* 13, 337. doi: 10.1186/1475-2875-13-337
- Santos, E. A., Sucupira, I., de Oliveira Martins, B. M., de Paula Souza E Guimarães, R. J., Catete, C. P., de Souza, R., et al. (2019). VK210 and VK247 genotypes of *Plasmodium vivax* in anopheline mosquitoes from Brazilian Amazon. *Sci. Rep.* 9 (1), 1–6. doi: 10.1038/s41598-019-45809-5
- Schappo, A. P., Bittencourt, N. C., Bertolla, L. P., Forcellini, S., da Silva, A. B. I. E., Dos Santos, H. G., et al. (2022). Antigenicity and adhesiveness of a *Plasmodium vivax* VIR-E protein from Brazilian isolates. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 116, e210227. doi: 10.1590/0074-02760210227
- Seidelin, H. (1912). Notes on some blood-parasites in man and mammals. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 5:4, 501–508. doi: 10.1080/00034983.1912.11686370
- Sounoun, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S., and Brown, K. N. (1993). Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58 (2), 283–292. doi: 10.1016/0166-6851(93)90050-8
- Soares, I. S., Levitus, G., Souza, J. M., Del Portillo, H. A., and Rodrigues, M. M. (1997). Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infection Immun.* 65 (5), 1606–1614. doi: 10.1128/iai.65.5.1606-1614.1997
- Soares, I. S., and Rodrigues, M. M. (2002). Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*. *Parasitology* 124 (Pt 3), 237–246. doi: 10.1017/s003118200100110x
- Stanisk, D. I., Fowkes, F. J., Koinari, M., Javati, S., Lin, E., Kiniboro, B., Richards, J. S., et al. (2015). Acquisition of antibodies against *Plasmodium falciparum* merozoites and malaria immunity in young children and the influence of age, force of infection, and magnitude of response. *Infection Immun.* 83 (2), 646–660. doi: 10.1128/IAI.02398-14
- Stone, S. L., and Lund, F. E. (2016). IgM memory cells: first responders in malaria. *Immunity* 45 (2), 235–237. doi: 10.1016/j.immuni.2016.08.005
- Struik, S. S., and Riley, E. M. (2004). Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol. Rev.* 201, 268–290. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00181.x
- SVS/MS (2022a) *Epidemiological Report – Malaria 2022. Boletim Epidemiológico. n Especial Brasília, DF, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.* (2020). Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-contenido/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no17.pdf> (Accessed February 2, 2023).
- SVS/MS (2022b) *Epidemiological Report – Malaria 2022. Boletim Epidemiológico. n Especial Brasília, DF, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.* (2020). Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-contenido/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no30.pdf/view> (Accessed February 2, 2023).
- Tazi, L., and Ayala, F. J. (2011). Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. P. simium and P. malariae v. P. brasilianum. *Infect. Genet. Evol.* 11 (1), 209–221. doi: 10.1016/j.meegid.2010.08.007
- Uplekar, S., Rao, P. N., Ramanathapuram, L., Awasthi, V., Verma, K., Sutton, P., et al. (2017). Characterizing Antibody Responses to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* Antigens in India Using Genome-Scale Protein Microarrays. *PLoS Negl Trop. Dis.* 11 (1), e0005323. doi: 10.1371/journal.pntd.0005323
- Vicentin, E. C., Francoso, K. S., Rocha, M. V., Iourtov, D., Dos Santos, F. L., Kubrusly, F. S., et al. (2014). Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 expressed in *Pichia pastoris* yeast. *Infect. Immun.* 82, 1296–1307. doi: 10.1128/IAI.01169-13
- World Health Organization (2022) *World malaria report 2022* (Geneva: World Health Organization). Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240064898> (Accessed January 11, 2023).
- Yamasaki, T., Duarte, A. M., Curado, I., Summa, M. E., Neves, D. V., Wunderlich, G., et al. (2011). Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. *J. Med. Primatol.* 40 (6), 392–400. doi: 10.1111/j.1600-0684.2011.00498.x



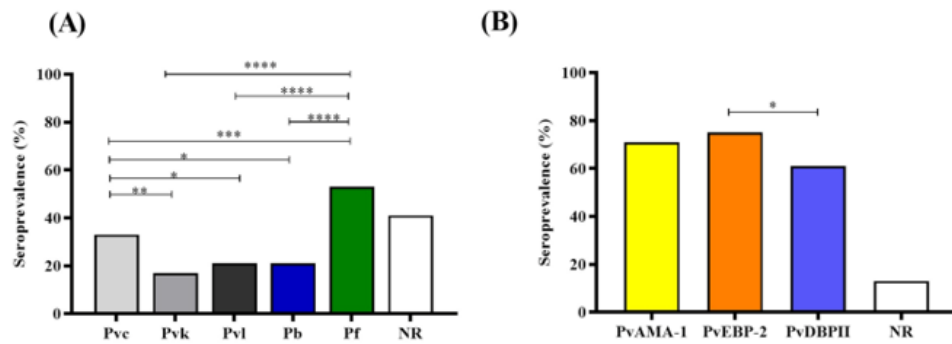
Supplementary Material

IgM antibodies response against *Plasmodium* antigens in neotropical primates in the Brazilian Atlantic Forest

Gabriela Maira Pereira de Assis¹, Denise Anete Madureira de Alvarenga¹, Luisa Braga e Souza¹, Juan Camilo Sánchez-Arcila², Eduardo Fernandes e Silva³, Anielle de Pina-Costa^{4,5,6,7}, Gustavo Henrique Pereira Gonçalves^{8,9}, Júlio César de Souza Junior³, Ana Julia Dutra Nunes^{8,10,9}, Alcides Pissinatti^{11,12}, Silvia Bahadian Moreira¹¹, Leticia de Menezes Torres¹, Helena Lott Costa¹, Herlandes da Penha Tinoco¹³, Valéria do Socorro Pereira¹³, Irene da Silva Soares¹⁴, Tais Nóbrega Sousa¹, Francis Babila Ntumngia¹⁵, John H. Adams¹⁵, Flora Satiko Kano¹, Zelinda Maria Braga Hirano^{7,8}, Lilian Rose Pratt Riccio⁶, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro^{5,6}, Joseli Oliveira Ferreira¹⁶, Luzia Helena Carvalho¹, Cristiana Ferreira Alves de Brito^{1*}

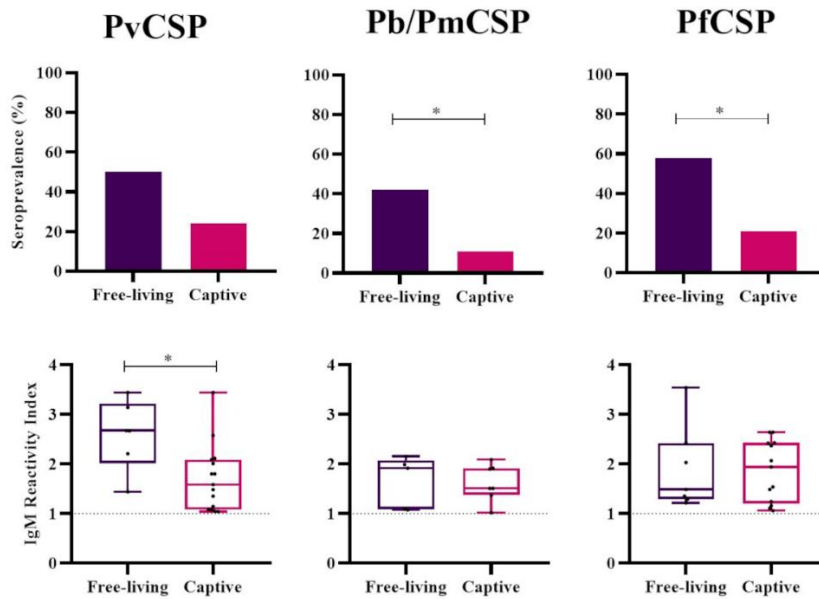
* Correspondence: Cristiana Ferreira Alves de Brito. cristiana.brito@fiocruz.br

Supplementary Material

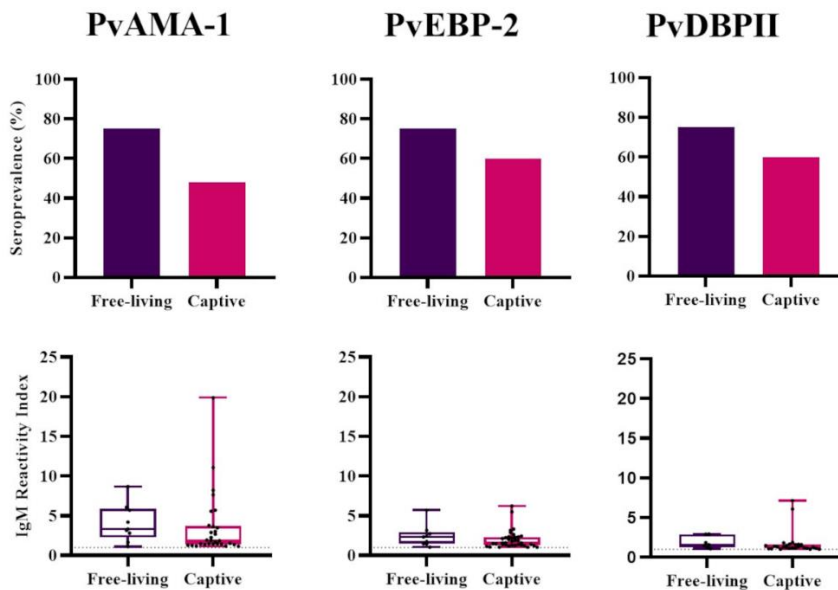


Supplementary Figure 1 – Seroprevalence of IgM antibodies against *Plasmodium* antigens of neotropical primates from all three studied areas. Seroprevalence of IgM antibodies against (A) circumsporozoite protein (CSP) peptides and (B) *Plasmodium vivax* erythrocytic stage antigens. Pvc: *P. vivax* CSP classic VK210 variant (light grey); Pvk: *P. vivax* CSP VK247 variant (grey); Pvl: CSP *P. vivax*-like variant (black); Pb/Pm: *P. brasilianum*/*P. malariae* CSP (blue); Pf: *P. falciparum* CSP (green); NR: Non-responder (white); PvAMA-1: *P. vivax* Apical Membrane Antigen 1 (yellow); PvEBP-2: *P. vivax* Erythrocyte Binding Protein 2 (Orange); PvDBPII: domain II of the *P. vivax* Duffy Binding Protein (blue). (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$).

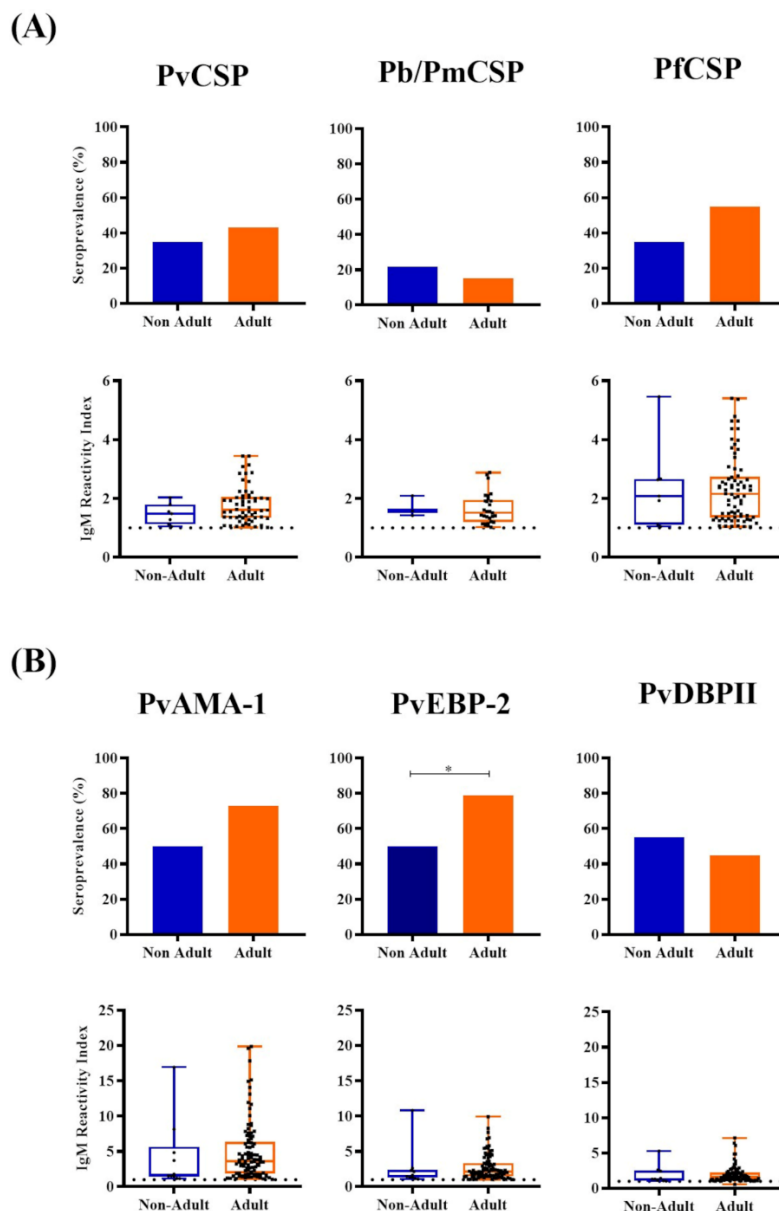
(A)



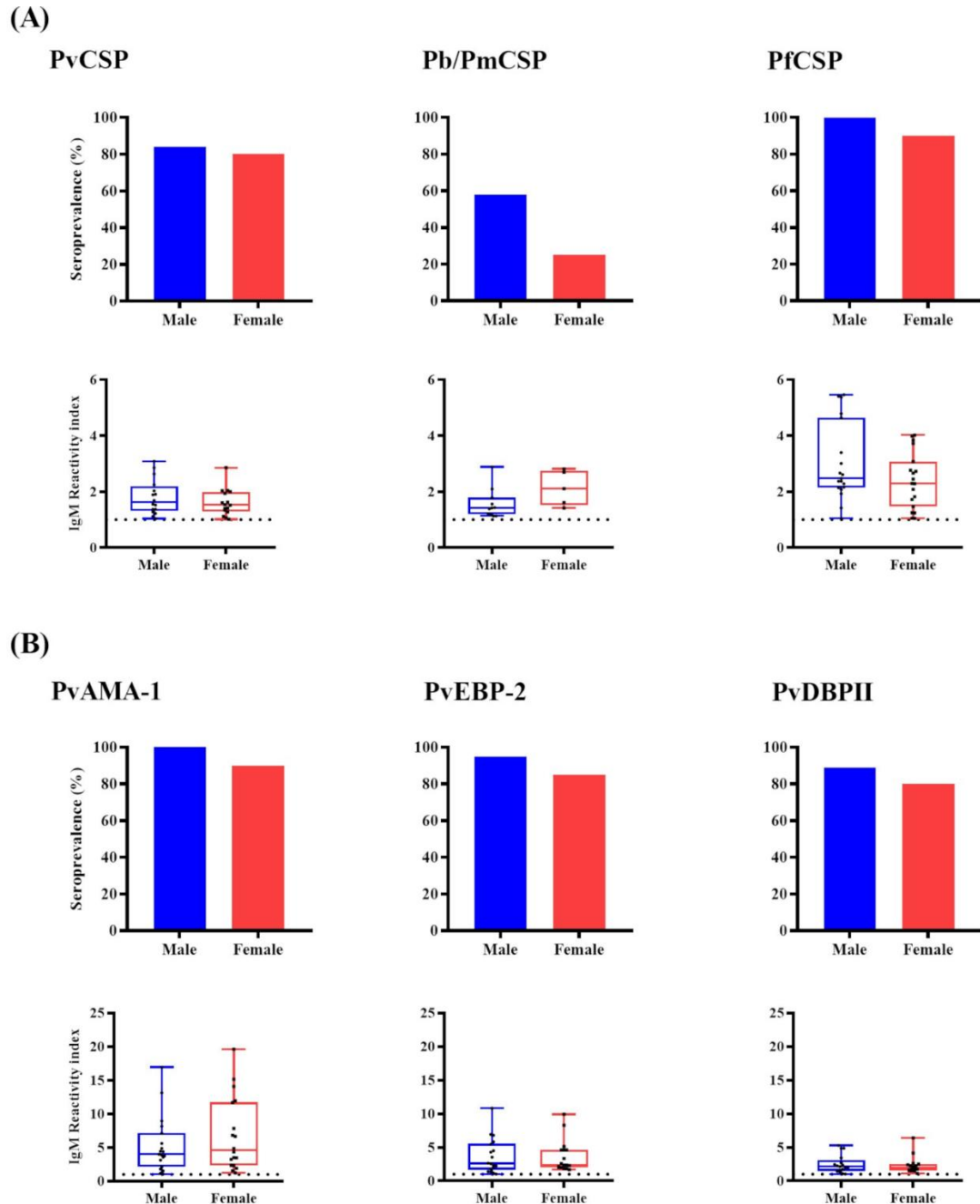
(B)



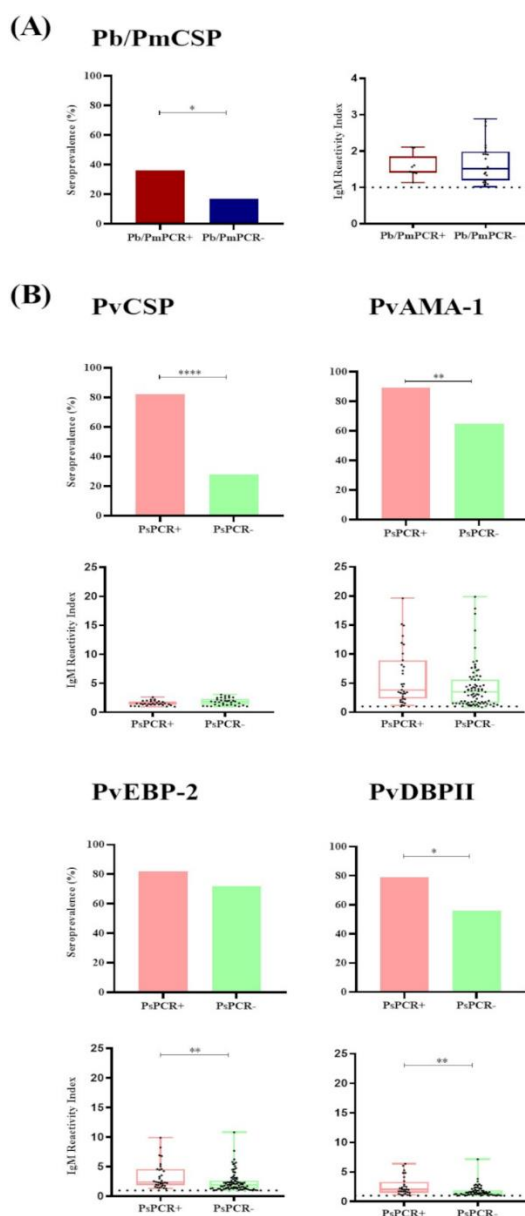
Supplementary Figure 2 - Seroprevalence and levels of antibodies against *Plasmodium* antigens in Free-living and Captive animals from Indaial/SC. Seroprevalence and reactivity index (RI) of IgM antibodies against (A) circumsporozoite protein (CSP) peptides and (B) *P. vivax* erythrocytic stage antigens. RI > 1 was considered positive (dotted line). The filled bars indicate the percentage of NP with RI > 1. Data expressed as individual RI values (dots) and median with the interquartile range (boxes). PvCSP: *P. vivax* CSP variants (VK210, VK247, and/or *P. vivax-like*); Pb/PmCSP: CSP repeat of *P. brasilianum/P. malariae*; PfCSP: CSP repeat of *P. falciparum*; PvAMA-1: *P. vivax* Apical Membrane Antigen 1; PvEBP-2: *P. vivax* Erythrocyte Binding Protein 2; PvDBPII: domain II of the *P. vivax* Duffy Binding Protein region. Free-living: purple; Captive: pink. Differences statistically significant were indicated by asterisk ($*P < 0.05$).



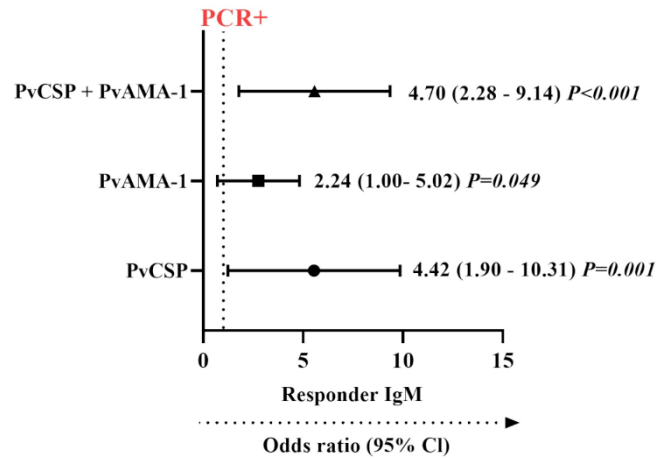
Supplementary Figure 3 - Seroprevalence and levels of IgM antibodies against *Plasmodium* antigens according to the age of Neotropical primates from Indaial/SC and Joinville/SC. (A) Seroprevalence and reactivity index (RI) of IgM antibodies against circumsporozoite protein (CSP) peptides. (B) Seropositivity and RI of IgM antibodies against *Plasmodium vivax* erythrocytic stage antigens. RI > 1 was considered positive (dotted line). The filled bars indicate the percentage of NP with RI > 1. Data expressed as individual RI values (dots) and median with the interquartile range (boxes). Age estimated according to **Carpenter, 1965, and categorized in non-Adult (blue) and Adult (orange). PvCSP: *P. vivax* CSP variants (VK210, VK247, and/or *P. vivax-like*); Pb/PmCSP: CSP repeat of *P. brasilianum/P. malariae*; PfCSP: CSP repeat of *P. falciparum*; PvAMA-1: *P. vivax* Apical Membrane Antigen 1; PvEBP-2: *P. vivax* Erythrocyte Binding Protein 2; PvDBPII: domain II of the *P. vivax* Duffy Binding Protein. Differences statistically significant were indicated by asterisk (* $P < 0.05$).**



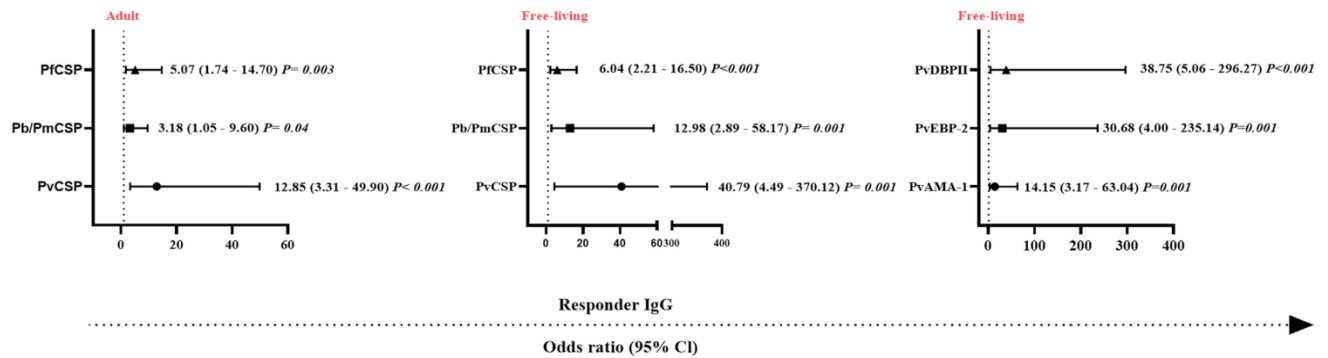
Supplementary Figure 4 - Association between IgM antibody responses and sex in free-living animals from Joinville/SC. (A) Seroprevalence and reactivity index (RI) of IgM antibodies against circumsporozoite protein (CSP) repeats. (B) Seroprevalence and RI of IgM antibodies against *Plasmodium vivax* erythrocytic stage antigens. RI > 1 was considered positive (dotted line). The filled bars indicate the percentage of NP with RI > 1. Data expressed as individual RI values (dots) and median with the interquartile range (boxes). PvCSP: *P. vivax* CSP variants (VK210, VK247, and/or *P. vivax*-like); Pb/PmCSP: CSP repeat of *P. brasilianum*/*P. malariae*; PfCSP: CSP repeat of *P. falciparum*; PvAMA-1: *P. vivax* Apical Membrane Antigen 1; PvEBP-2: *P. vivax* Erythrocyte Binding Protein 2; PvDBPII: domain II of the *P. vivax* Duffy Binding Protein. Male: blue; Female: red. No comparison showed a statistically significant difference.



Supplementary Figure 5 - Association between IgM responses according to active *Plasmodium* infection of animals from all three studied areas. (A) Seroprevalence and reactivity index (RI) of IgM antibodies against *P. brasilianum*/*P. malariae* circumsporozoite protein (CSP) peptide in monkeys with PCR positive for *P. brasilianum*/*P. malariae* (Pb/PmPCR+, red) or negative (Pb/PmPCR-, blue). (B) Seroprevalence and RI of IgM antibodies against *P. vivax* CSP and erythrocytic stage antigens in monkeys with PCR positive for *P. simium* (PsPCR+, salmon) or negative (PsPCR-, light green). RI > 1 was considered positive (dotted line). The filled bars indicate the percentage of NP with RI > 1. Data expressed as individual RI values (dots) and median with the interquartile range (boxes). Pb/PmCSP: CSP repeat of *P. brasilianum*/*P. malariae*; PvCSP: *P. vivax* CSP repeats (VK210, VK247, and/or *P. vivax*-like); PvAMA-1: *P. vivax* Apical Membrane Antigen 1; PvEBP-2: *P. vivax* Erythrocyte Binding Protein 2; PvDBPII: domain II of the *P. vivax* Duffy Binding Protein. Differences statistically significant were indicated by asterisk (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ** $P < 0.0001$).**



Supplementary Figure 6 - Odds ratio for IgM antibody responses of Neotropical primates against circumsporozoite protein (CSP) and/or AMA-1 of *Plasmodium vivax* according to PCR positivity. PvCSP: *P. vivax* CSP variants (VK210, VK247, and/or *P. vivax-like*); PvAMA-1: *P. vivax* Apical Membrane Antigen 1. The data shown are only the significant values for the odds ratios (logistic Regression, $P < 0.05$).



Supplementary Figure 7 – Odds ratios for IgG antibody responses of Neotropical primates against different *Plasmodium* antigens according to different sampling parameters. Comparison of the odds ratio for seroprevalence of IgG against various circumsporozoite protein (CSP) peptides from different *Plasmodium* species and *P. vivax* erythrocytic stage antigens according to NP age (adult or non-adult) and whether sampled individuals were either free-living or captive. PvCSP: *P. vivax* CSP variants (VK210, VK247, and/or *P. vivax-like*); Pb/PmCSP: CSP repeat of *P. brasilianum/P. malariae*; PfCSP: CSP repeat of *P. falciparum*; PvAMA-1: *P. vivax* Apical Membrane Antigen 1; PvEBP-2: *P. vivax* Erythrocyte Binding Protein 2; PvDBP-II: domain II of the *P. vivax* Duffy Binding Protein. The data shown are only the significant values for the odds ratios (logistic Regression, $P < 0.05$). The free-living versus captive comparison was performed only for the group of NP from Indaial/SC.

5.3 Padronização da imunofenotipagem de Células T de Primatas Neotropicais naturalmente exposto ao *Plasmodium* sp.

Amostras de PBMCs congeladas de neotropicais, obtidos no Centro de Pesquisas biológicas de Indaial (CEPESBI), N=7, Centro de primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ), N=5, sendo esses PN considerados o nosso grupo de exposto à transmissão da malária. O grupo não-exposto foi composto por 3 animais da Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZ) Amostras dos primatas neotropicais, foram submetidas à marcação de receptores de superfície com um painel de anticorpos para subpopulações de subpopulações de células T para avaliação por citometria de fluxo. Pitcher e colaboradores (2002) previamente descreveram marcadores, os quais foram usados como estratégia de análise.

Inicialmente as amostras de PBMC foram descongeladas rapidamente para então serem submetidas à marcação. Após constatarmos uma baixa viabilidade das células nos primeiros ensaios, o protocolo de descongelamento foi modificado. No qual as amostras do PN passaram a serem descongeladas delicadamente, para evitar mudanças bruscas de temperatura que poderiam matar as células.

Resumidamente, após a marcação, avaliamos a frequência de células T total viáveis (CD3+), células T auxiliares (CD4+ CD8-), células T citotóxicas (CD8 + CD4-), células T Naïve (CD28+ CD95-), células T de memória central (CD28+CD95+) e células T de memória efetora (CD28-CD95+).

Durante a padronização do ensaio de citometria de fluxo as amostras de PBMC apresentaram variações de viabilidade (marcadas com corante Live/Dead), entre 4% e 75% (média 31,17%) indicando melhoras após as modificações do protocolo de descongelamento utilizado (TABELA 7). Posteriormente analisamos as frequências de células T totais (CD3+). No qual também foram observadas um aumento na frequência de células T totais ao comparar as espécies do gênero (*Alouatta*, *Aotus*) de duas regiões antes da mudança do protocolo e após (TABELA 8).

Tabela 7 – Comparação da média de viabilidade das células totais de duas espécies de PNH em diferentes regiões antes da mudança do protocolo e após.

Viabilidade Média - Células totais			
Local de coleta	Espécies	Antes	Após
FPMZ (Belo Horizonte /MG)	<i>Aotus nigriceps</i>	35,90%	68,40%
FPMZ (Belo Horizonte /MG)	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	27,35%	51,50%
Indaial/SC	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	4,73%	17,85%

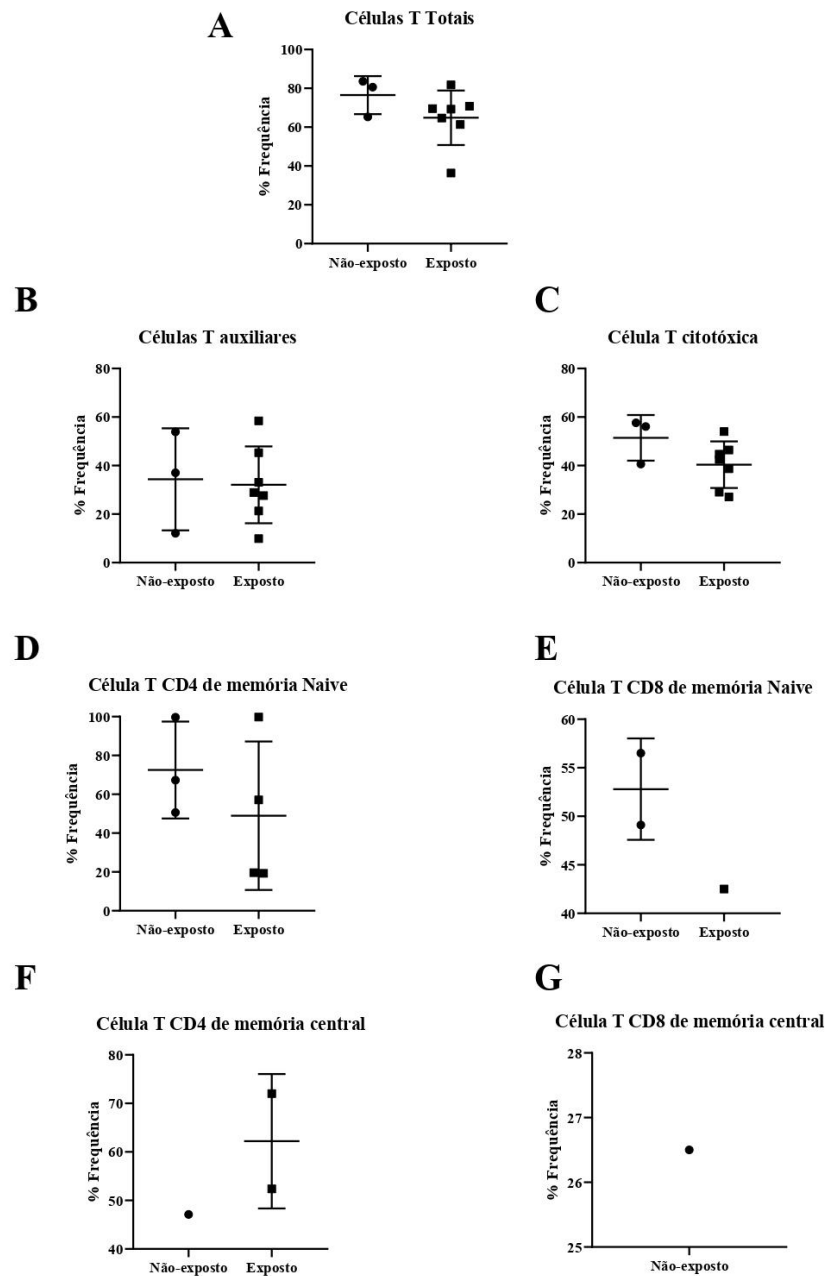
Tabela 8 – Comparação da média de viabilidade das células T totais (CD3+) de duas espécies de PNH em diferentes regiões antes da mudança do protocolo e após.

Viabilidade Média - CD3+			
Local de coleta	Espécies	Antes	Após
FPMZ (Belo Horizonte /MG)	<i>Aotus nigriceps</i>	72,3%	83,6%
FPMZ (Belo Horizonte /MG)	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	59,1%	65,3%
Indaial/SC	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	3,06%	48,9%

A partir deste momento, usando o novo protocolo de descongelamento, foram selecionados os animais que apresentavam uma viabilidade acima de 10% (N= 3 grupo não-exposto e N= 7 grupo exposto). Sendo observadas médias de frequências de células T totais vivas de 76,50% ($\pm 9,81$) nos NP do grupo controle e 64,84% ($\pm 14,06$) nos NP do grupo exposto (FIGURA 13 A). As frequências das subpopulações de células T auxiliares (CD4+ CD8-) foram similares entre os grupos, 34,33% no grupo não-exposto e 32,07% no grupo exposto. As frequências de células T citotóxicas (CD8 + CD4-) foram de 51,43% e 40,34%, no grupo não-exposto e exposto, respectivamente (FIGURA 13 B e C).

Na avaliação das subpopulações de células T auxiliares (CD4+) de memória Naïve (CD28+CD95-) e células T de memória central (CD28+CD95+) observamos frequências de 72,53% e 47,10% no grupo não-exposto e frequências de 48,95% e 62,20% no grupo exposto, respectivamente (Figura 13 D e F). Ao se avaliar as mesmas subpopulações em células T citotóxicas (CD8+), se observou uma frequência de 52,80% (n=2) de células de memória Naïve (CD28+CD95-) no grupo não-exposto e 42,50% no grupo exposto (n=1). Somente em um exemplar (*Aotus*) se observou a população células T de memória central, isso pode ter ocorrido pela marcação insuficiente do CD95 nos outros animais do grupo não-exposto e exposto (Figura 13 E e G). Não foram observadas diferenças entre as frequências dos dois grupos testados (Mann Whitney $p > 0.05$) e nem células de memória efetora (CD28- e CD95 +).

Figura 13 - Subpopulações de células T em primatas neotropicais não-expostos e expostos ao *Plasmodium* sp.



Legenda: Os gráficos mostram a frequência relativa de subpopulações de células T a partir do total de células T (CD3+) pela citometria de fluxo. As subpopulações de células T foram identificadas conforme as estratégias mostradas na Figura 13 em: (A) Células T totais, (B) Células T auxiliares, (C) Células T citotóxicas, (D) Células T auxiliares de Memória Naive, (E) Células T citotóxica de Memória Naive, (F) Células T auxiliares de Memória Central e (G) Células T citotóxica de Memória Central. Cada ponto no gráfico representa um primata neotropical; as linhas horizontais indicam a média e desvio padrão.

6. DISCUSSÃO

A geração de uma resposta imune adaptativa contra o *Plasmodium* sp. é frequentemente demorada e não esterilizante. Indivíduos que saem de áreas endêmicas perdem rapidamente suas respostas de células T e B, sugerindo que a exposição contínua a antígenos de *Plasmodium* é necessária não apenas para a indução de células efetoras e de memória, mas também para sua manutenção (Antonelli *et al.*, *et al.*, 2020). Entender melhor os principais mecanismos que mantêm a parasitemia submicroscópica em indivíduos assintomáticos e por que, em alguns indivíduos, o sistema imunológico é incapaz de eliminar completamente o parasito pode fornecer pistas importantes sobre os mecanismos de resistência à infecção mediados pelo sistema imunológico e como projetar uma vacina eficaz para malária (Antonelli *et al.*, *et al.*, 2020).

Diante disso, de forma inédita foi iniciada a padronização de um painel imunofenotipagem para caracterizar subpopulações de células T de primatas neotropicais naturalmente expostos à infecção por *Plasmodium* sp., baseado na experiência prévia da Dra. Cristiana Brito em modelo *Aotus* experimentalmente infectados por *P. vivax*, utilizando sangue fresco. E no protocolo de caracterização de células T de memória em PNH de Pitcher *et al.*, 2002.

Nossa primeira limitação foi obter amostras com viabilidade celular alta, sendo necessário mudar o procedimento de descongelamento para recuperar mais células vivas. Com maiores viabilidades observadas nos exemplares do gênero *Aotus*, e aparentemente as células dos animais do gênero *Alouatta* são mais sensíveis ao descongelamento, sendo necessário uma nova otimização do protocolo. Vale destacar que foram utilizados PBMCs armazenados no nitrogênio líquido à pelo menos 3 anos. Existe uma falta de dados mostrando os reais efeitos do processo de separação, transporte e tempo de armazenamento e seus impactos sobre a viabilidade celular, recuperação e funcionalidade. No entanto, já foi demonstrado que o armazenamento de PBMC por menos de 15 meses em nitrogênio líquido não alterou a expressão gênica das células (Yang *et al.*, 2016). Vários trabalhos vêm estudando a perda da viabilidade e funcionalidade de células T humanas congeladas (Owen *et al.*, 2007; German *et al.*, 2013). Não se tem conhecimento se os PBMCs de PNH são mais sensíveis ao congelamento e descongelamento.

Não foram observadas diferenças nas frequências de células T e suas subpopulações, entre o grupo não-exposto e exposto. Um segundo desafio enfrentado, foi a não observação de células T de memória efetora (CD28-CD95+). O que pode ser explicado pela marcação insuficiente do CD95, principalmente nos animais da família Atelidae, necessitando de uma nova titulação

desse anticorpo para esses animais. Esse é um grande fator limitante já demonstrado pela literatura, a dificuldade de se obter anticorpos que funcionem em animais de todas as famílias de primatas neotropicais, uma vez que esses reagentes geralmente são bem caracterizados para animais do velho mundo (Riccio *et al.*, 2015; Lugli *et al.*, 2013).

A similaridade entre as frequências células também podem ser decorrente da não utilização de estímulos com antígenos do parasito para especificar a resposta observado nos animais não-exposto e expostos. Os resultados obtidos na citometria de fluxo são preliminares e os ensaios apresentam o número amostral como fator limitante, no entanto de forma inédita, foi iniciada a padronização de um painel de imunofenotipagem de célula T para primatas neotropicais da mata atlântica brasileira. Sendo um avanço científico uma vez que se sabe do papel da célula T na resposta a fase eritrocítica da malária e indução e manutenção anticorpos (Miller *et al.*, 2002; Mount *et al.*, 2004; Antonelli *et al.*, *et al.*, 2020).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Cada área de estudo apresentam características epidemiológicas singulares, refletindo a exposição dos animais à infecção por *Plasmodium* sp.
- Altos níveis de anticorpos IgM e IgG contra peptídeos pré-eritrócíticos de *Plasmodium* sp. foram detectados em primatas neotropicais da Mata Atlântica brasileira, comprovando que esses animais são expostos à picada de Anopheles infectado.
- Níveis significantes de anticorpos IgM e IgG contra diferentes antígenos eritrócíticos de *Plasmodium* sp. também foram detectados nos NP, comprovando o estabelecimento da fase sanguínea da infecção em alguns animais.
- Altos níveis de anticorpos IgM foram observados contra o antígeno PvAMA-1 e altos níveis de IgG foram observados contra PvEBP-2.
- A soropositividade e altos níveis de anticorpos foram associadas principalmente com as covariáveis: vida livre e infecção ativa (PCR+).
- Primatas neotropicais adultos apresentam maior prevalência e níveis de anticorpos comparados com animais não-adultos, assim como ocorre com os humanos.
- Não houve associação entre a resposta imune e o sexo do animal.
- Foram observadas correlações positivas entre os níveis de anticorpos dos diferentes antígenos da mesma espécie de *Plasmodium*.
- De forma inédita foram avaliadas a resposta de IgM e IgG contra PvEBP-2 em primatas não humanos. Sendo observado altos níveis de anticorpos, em NP adultos infectados por *P. simium*, assim como demonstrado em crianças mais velhas na África.
- Pela primeira vez foram avaliados a presença de anticorpos IgM contra as antígenos pré-eritrocíticos e eritrocíticos de *Plasmodium brasilianum*/ *P. malariae* e *Plasmodium falciparum*. Demonstrando que os NP são expostos e apresentam infecção sanguínea por esses parasitos. E comprovando a circulação dessas espécies de *Plasmodium* na Mata Atlântica.
- Anticorpos contra antígenos do *Plasmodium falciparum* foram detectados nos NP, reforçando a necessidade de se avaliar a circulação desse parasito ou do *P. falciparum-like* na região de Mata Atlântica.
- Animais que apresentam anticorpos IgM contra PvCSP e PvAMA-1 possuem maior chance de terem infecção ativa (PCR+). Podendo esses marcadores sorológicos serem utilizados como ferramenta de rastreio de animais infectados.

- Primatas neotropicais das 5 famílias estão expostos à transmissão da doença, porém a infecção eritrocítica se estabelece aparentemente apenas em algumas famílias específicas.
- Primatas neotropicais da família *Atelidae* apresentam altos níveis de IgM e IgG contra os antígenos de *Plasmodium* sp., o que sugere que esses animais são os potenciais reservatório da malária na Mata Atlântica Brasileira.
- Pela primeira vez foi iniciada a padronização de um painel de imunofenotipagem de célula T para primatas neotropicais da mata atlântica brasileira.

8. CONCLUSÃO

Primatas neotropicais naturalmente expostos à transmissão de *Plasmodium* sp. apresentam anticorpos IgM e IgG contra diferentes antígenos pré-eritrocíticos e eritrocíticos. Os achados deste trabalho demonstram que a resposta imune naturalmente adquirida contra a malária dos PN é similar a dos humanos, sugerindo serem modelos de estudo interessante para a doença. Além de sugerir a alta circulação de diferentes espécies de *Plasmodium* na Mata Atlântica brasileira, onde esses hospedeiros são potenciais reservatórios da doença. Adicionalmente, a caracterização da resposta imune celular dos primatas neotropicais, irá ajudar a compreender melhor a infecção natural do *Plasmodium* sp. em seus hospedeiros naturais e seus impactos na vida do animal.

9. REFERÊNCIAS

- ABREU, F. V. S. *et al.* Howler monkeys are the reservoir of malarial parasites causing zoonotic infections in the Atlantic forest of Rio de Janeiro. **PLoS Negl Trop Dis**, v.13, n. 12, p. e0007906, 2019
- ADAMS, J. H. *et al.* A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Microbiology**, v. 89, n. 15, p. 7085–7089, 1992.
- ADAMS, J. H. *et al.* The duffy receptor family of *Plasmodium knowlesi* is located within the micronemes of invasive malaria merozoites. **Cell**, v. 63, n. 1, p. 141–153, 1990.
- AIKAWA, M. *et al.* Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocytes and parasite. **J Cell Biol**, v. 77, p. 72-82, 1978.
- ALTEVOGT, B. M. *et al.* Research agenda. Guiding limited use of chimpanzees in research. **Science**, v. 335, p.41–2, 2012.
- ALVARENGA D. A. *et al.* New potential *Plasmodium brasilianum* hosts: tamarin and marmoset monkeys (family Callitrichidae). **Malar J**, v. 16, n. 1, p. 71, 2017.
- AMINO, R. *et al.* Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. **C R Biol**, v. 329, n. 11 p. 858-62, 2006.
- ANDRADE, J.C.R, *et al.* Foco de malária no estado de São Paulo (Brasil). **Rev Saude Publica**. v. 20p. 323–326, 1986
- ANTINORI, S. *et al.* *Plasmodium knowlesi*: the emerging zoonotic malaria parasite. **Acta Trop**, v. 125, n. 2, p.191-201, 2013.
- Antonelli LR, *et al.* The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. **Immunol Rev**. v. 293, n. 1, p. 163-189, 2020.
- ARAMA, C. *et al.* Genetic Resistance to Malaria Is Associated With Greater Enhancement of Immunoglobulin (Ig)M Than IgG Responses to a Broad Array of *Plasmodium falciparum* Antigens. **Open Forum Infect Dis**, n. 2, v. 3, p, ofv118, 2015.
- ARNOT, D. E. *et al.* Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science**, v. 230, n. 4727, p.815-8, 1985.
- ARRUDA, M. E. de. Presença do *Plasmodium brasilianum* em macacos capturados na área de enchimento do reservatório da usina hidrelétrica de Tucuruí, Pará. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.80, n.3, p.367-369, 1985.
- ARRUDA, M. E. *et al.* Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 367-71, 2007.
- ASSIS, G. M. *et al.* Detection of *Plasmodium* in faeces of the New World primate *Alouatta clamitans*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.111, n. 9, p. 570-576, 2015.

BABAEKHO L, ZAKERI S, DJADID ND. Genetic mapping of the duffy binding protein (DBP) ligand domain of *Plasmodium vivax* from unstable malaria region in the Middle East. **Am J Trop Med Hyg.** v. 80, n. 1, p. 112-8. 2009 Erratum in: **Am J Trop Med Hyg**, v. 103, n. 4, p. 1750, 2020.

BAIRD, J. K. *et al.* Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. **Am J Trop Med Hyg**, 45, n. 1, p. 65-76, 1991.

BARATA, R. Malaria in Brazil: trends in the last ten years. **Cad Saude Publica**, v.11, p. 128-136, 1995.

BARBEDO, M. B. *et al.* Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.** v. 102, n.3, p. 335-9, 20077.

BARBER, B. E. *et al.* World Malaria Report: time to acknowledge *Plasmodium knowlesi* malaria. **Malar J**, v.16, n. 1, p. 135, 2017.

BARNWELL, J. W. Antigens of *Plasmodium vivax* blood stage parasites identified by monoclonal antibodies. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 56-61, 1986.

BARRY, A. E. & ARNOTT, A. Strategies for designing and monitoring malaria vaccines targeting diverse antigens. **Front Immunol**, v. 28, n. 5, p. 359, 2014.

BATON, LA; RANFORD-CARTWRIGHT, LC. *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut epithelium of *Anopheles stephensi* is consistent with the Time Bomb model. **Parasitology**, v. 129 (Pt 6), p.663-76, 2014.

BEHET, MC, *et al.* The Complement System Contributes to Functional Antibody-Mediated Responses Induced by Immunization with *Plasmodium falciparum* Malaria Sporozoites. **Infect Immun**, v.86, n. 7, p. e00920-17, 2018.

BEIGNON, AS; LE GRAND, R; CHAPON, C. In vivo imaging in NHP models of malaria: challenges, progress and outlooks. **Parasitol Int**, v. 63, n. 1, p. 206-15, 2014.

BIRKENMEYER, L, *et al.* Isolation and characterization of the MSP1 genes from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 82, p. 996–1003, 2010.

BIRYUKOV S, *et al.* Complement and Antibody-mediated Enhancement of Red Blood Cell Invasion and Growth of Malaria Parasites. **EBioMedicine**, v. 9, p. 207-216, 2016.

BITONTI, AJ; MCCANN, PP; SJOERDSMA, A. The effects of polyamine analogues on malaria parasites in vitro and in vivo. **Adv Exp Med Biol**, v. 250, p. 717-26, 1988.

BONILLA, JA *et al.* Genetic diversity of *Plasmodium vivax* Pvcsp and Pvmsp1 in Guyana, South America. **Am J Trop Med Hyg**, v. 75, n. 5, p. 830-5, 2006.

BOONYARATANAKORNKIT, J; TAYLOR, JJ. Immunoglobulin M, more than just an early responder to malaria. **Immunol Cell Biol**, v. 97, n. 9, p. 771-773, 2019.

BORGES DA SILVA, H *et al.* CD28 deficiency leads to accumulation of germinal-center independent IgM⁺ experienced B cells and to production of protective IgM during experimental malaria. **PLoS One**, v.13, n.8, p: e0202522, 2018.

BOYLE, MJ *et al.* IgM in human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. **Sci Adv**, v. 5, n. 9, p, eaax4489, 2019.

BOYLE, M. J. *et al.* Human antibodies fix complement to inhibit *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. **Immunity**, v. 42, n. 3, p. 580–590, 2015.

BRAGA, É. M.; FONTES, C. J. |F.; KRETTLI, A. U. Persistence of Humoral 68 Response against Sporozoite and Blood- Stage Malaria Antigens 7 Years after a Brief Exposure to *Plasmodium vivax*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 4, p. 1132–1135, 1998.

BRANQUINHO, M. S. *et al.* Infection of Anopheles (Kerteszia) cruzii by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium vivax* variant VK247 in the municipalities of São Vicente and Jquitiba, São Paulo. **Rev Panam Salud Publica**, v. 2, n. 3, p. 189-93, 1997.

BRASIL, P. *et al.* Malaria, a difficult diagnosis in a febrile patient with sub-microsparasitemia and polyclonal lymphocyte activation outside the endemic region, in Brazil. **Malar J**, v. 12, p. 402, 2013.

BRASIL, P. *et al.* Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet Glob Health**, v. 5, n. 10, p. 1038-e1046, 2017.

BRAZ, A. R. P. *et al.* Caracterização dos casos de malária na região extra amazônica brasileira entre 2012 a 2017. **J Manag Prim Health Care**, v. 2, p. e5, 2020.

BRAZ, R. M. *et al.* Avaliação da completude e da oportunidade das notificações de malária na Amazônia Brasileira, 2003-2012. **Epidemiol Serv Saude**, v. 25, n. 1, p.21-32, 2016.

BRAZ, R. M. *et al.* Caracterização das epidemias de malária nos municípios da Amazônia Brasileira em 2010. **Cad Saude Publica**, v. 29, n. 5, p. 935-44, 2013.

BRONNER, U. *et al.* Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. **Malar J**, v. 8, p.15, 2009.

BUERY, JC *et al.* Atlantic Forest Malaria: A Review of More than 20 Years of Epidemiological Investigation. **Microorganisms**. v. 9, n. 1, p, 132, 2021.

BUERY, JC *et al.* Mitochondrial genome of *Plasmodium vivax/simum* detected in an endemic region for malaria in the Atlantic Forest of Espírito Santo state, Brazil: do mosquitoes, simians and humans harbour the same parasite? **Malar J**, v. 16, n. 1, p. 437, 2017.

BWIRE, R *et al.* Malaria anticircumsporozoite antibodies in Dutch soldiers returning from sub-Saharan Africa. **Trop Med Int Health**, v. 3, n. 1, p. 66-9, 1998.

CARRÉRI-BRUNO, G. C. *et al.* Malaria acquired during entomological research in the Serra do Mar, southeastern region of Brazil. **Rev Saúde Pública**, v. 29, p. 142-143, 1995.

CARVALHO, M.E. *et al.* Nota sobre o encontro de casos autóctones de malária vivax por meio de técnica sorológica em São Paulo. **Cad Saude Publica**, v.1, p. 250–252, 1985.

CAVASINI, C. E. *et al.* *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? Transactions of the Royal **Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 1042-104, 2007.

CERÁVOLO, I. P. *et al.* Anti-*Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein Antibodies Measure Exposure to Malaria in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, n. 6, p. 675–681, 2005.

CERAVOLO, I. P. *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.

CERAVOLO, I. P. *et al.* Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, n. 3, p. 502–510, 2009.

CERUTTI-JUNIOR, C. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. **Mal Jour**, v. 6, n. 33, p. 1-12, 2007.

CHAN, J.-A. *et al.* Targets of antibodies against *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in malaria immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 9, p. 3227–3238, 2012.

CHAN, J.-A.; FOWKES, F. J. I.; BEESON, J. G. Surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 19, p. 3633–3657, 2014.

CHARPENTER, C. R The Howlers of Barro Colorado Island, in *Primates Behavior* (New York: Holt, Rinehart and Winston), p. 250–291, 1965.

CHAVES, K. M. Malária em Minas Gerais, Brasil, situação 2007 a 2012. **Secretaria do Estado da Saúde MG**, 2013.

CHIN, W. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. **Science**, v. 149, p. 865, 1965.

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. 1–7, 2012.

CHOOTONG, P. *et al.* Mapping epitopes of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein with naturally acquired inhibitory antibodies. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 3, p. 1089–1095, 2010.

COATNEY, G. R. *et al.* CD-ROM. 2003. The primate malarias. [original book published 1971] Atlanta (GA): CDC.

COATNEY, G. R. Relapse in malaria--an enigma. **J Parasitol**, v. 62, n. 1, p. 3-9, 1976.

COCHRANE, A. H., *et al.* Further studies on the antigenic diversity of the circumsporozoite proteins of the *Plasmodium cynomolgi* complex. **Am J Trop Med Hyg**, v. 35, n. 3, p. 479-87, 1986.

COCHRANE, A. H., *et al.* Monoclonal Antibodies Produced Against Sporozoites of the Human Parasite *Plasmodium malariae* Abolish Infectivity of Sporozoites of the Simian Parasite *Plasmodium brasilianum*. **Infect. immune**. v. 50, n. 1, p. 58-61, 1985.

COHEN, S; BUTCHER, G. A; CRANDALL, R. B. Action of malarial antibody in vitro. **Nature**. v. 223, n. 5204, p. 368-71, 1969.

COHEN, S; BUTCHER, GA. Properties of protective malarial antibody. **Immunology**. v. 19, n. 2, p. 369-83, 1970.

COHEN, S; MCGREGOR, I. A; CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**, v. 192, p. 733-7, 1961.

COLE-TOBIAN, J. L. *et al.* Age- Acquired Immunity to a *Plasmodium vivax* Invasion Ligand, the Duffy Binding Protein. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 4, p. 531-539, 2002.

COLE-TOBIAN, J; KING, C. L. Diversity and natural selection in *Plasmodium vivax* Duffy binding protein gene. **Mol Biochem Parasitol**, v. 127, p. 121-32, 2003.

COLE-TOBIAN, J. L. *et al.* Strain-specific duffy binding protein antibodies correlate with protection against infection with homologous compared to heterologous *Plasmodium vivax* strains in Papua New Guinean children. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 4009-4017, 2009a.

COLE-TOBIAN, J. L. *et al.* Strain-Specific Duffy Binding Protein Antibodies Correlate with Protection against Infection with Homologous Compared to Heterologous *Plasmodium vivax* Strains in Papua New Guinean Children. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 4009-4017, 2009b.

COLEY, AM *et al.* Structure of the malaria antigen AMA1 in complex with a growth-inhibitory antibody. **PLoS Pathog**. 2007 Sep 7;3(9):1308-19. doi: 10.1371/journal.ppat.0030138. Erratum in: **PLoS Pathog**, v. 3, n. 11, p. e172, 2007.

COLLINS, W. E; JEFFERY, G. M. A retrospective examination of mosquito infection on humans infected with *Plasmodium falciparum*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 68, p. 366-371, 2003.

COLLINS, W. E. *et al.* Infection of mosquitoes with *Plasmodium vivax* from chimpanzees using membrane feeding. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v35, p. 56-60, 1986.

COLLINS, W. E. *et al.* Studies on the Salvador I strain of *Plasmodium vivax* in non-human primates and anopheline mosquitoes. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 80, p. 228- 235, 2009.

COLLINS, W. E. *Plasmodium knowlesi*: a malaria parasite of monkeys and humans. **Annu Rev Entomol**, v.57, p. 107-21, 2012.

COLLINS, W. E. *et al.* Sporozoite-induced infections of the Salvador I strain of *Plasmodium vivax* in Saimiri sciureus boliviensis monkeys. **J. Parasitol**, v. 74, p. 582-585, 1988.

- COLLINS, W. *et al.* Transmission of *Plasmodium simium* to *Aotus nancymai*, *A. vociferans*, *A. azarae boliviensis*, and *Saimiri sciureus boliviensis* monkeys. **J Parasitol**, v. 73, p. 653-655, 1987.
- CONWAY, JR; LEX, A; GEHLENBORG, N. UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. **Bioinformatics**, v. 33, n. 18, p. 2938-2940, 2017.
- COPPI, A. *et al.* The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. **J Exp Med**, v. 208, n. 2, p. 341-56, 2011.
- COSTA, A. P. *et al.* Delayed diagnosis of malaria in a dengue endemic area in the Brazilian extra-Amazon: recent experience of a malaria surveillance unit in state of Rio de Janeiro. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, p. 571-574, 2010.
- COSTA, D. C. *et al.* *Plasmodium simium/Plasmodium vivax* infections in southern brown howler monkeys from the Atlantic Forest. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 641-53, 2014.
- COUPER, KN *et al.* Parasite-specific IgM plays a significant role in the protective immune response to asexual erythrocytic stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. **Parasite Immunol**. v. 27, n. 5, p. 171-80, 2005.
- COUTO, R. D *et al.* Malária autóctone notificada no estado de São Paulo, 1980 a 2007. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, p. 52, 2010.
- COX-SINGH, J; SINGH, B. Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? **Trends Parasitol**, v. 24, n. 9, p. 406-10, 2008.
- COX-SINGH, J. Zoonotic Malaria: *Plasmodium Knowlesi*, an Emerging Pathogen. **Curr. Opin. Infect. Dis**, v. 25, n. 5, p. 530–536, 2012.
- CREWETHER, PE, *et al.* Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. **Infect Immun**, v. 64, n. 8, p. 3310-7, 1996.
- CROMPTON, PD *et al.* Malaria immunity in man and mosquito: insights into unsolved mysteries of a deadly infectious disease. **Annu Rev Immunol**, v. 32, p. 157-87, 2014.
- CURADO, I. *et al.* Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae/P. brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 235-243, 1997.
- CURADO, I. *et al.* Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. **Acta Tropica**, v. 100, p. 54-62, 2006.
- CUTTS, JC *et al.* Immunological markers of *Plasmodium vivax* exposure and immunity: a systematic review and meta-analysis. **BMC Med**. v. 12, p. 150, 2014.
- da FONSECA, F. Plasmódio de primata do Brasil. **Mem. Inst Osw Cruz**, v. 49, p. 543-555, 1951.

DALY, T M; C A, Long. Humoral response to a carboxyl-terminal region of the merozoite surface protein-1 plays a predominant role in controlling blood-stage infection in rodent malaria. **Journal of immunology**, vol. 155, n. 1, p. 236-43, 1995.

de ALVARENGA, D. A. *et al.* Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. **Malar J**, v. 14, p. 81, 2015.

de ALVARENGA, D. A. M. *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.

De ARRUDA, M. E. *et al.* Sero-epidemiological studies of malaria in indian tribes and monekys of the Amazon basin of Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.4, p.379-385, 1989.

de CASSAN, S. C. *et al.* Preclinical Assessment of Viral Vectored and Protein Vaccines Targeting the Duffy-Binding Protein Region II of *Plasmodium Vivax*. **Front Immunol**, v. 6, p. 348, 2015.

DE FRANCO, AL. The germinal center antibody response in health and disease. **F1000Research**, v. 5, Suppl 1, 2016. DOI: 10.12688/f1000research.7717.1

DE JONG, R.M. *et al.* Immunity against sexual stage *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites. **Immunol Ver**, v. 293, n.1, p. 190-215, 2020.

de PINA-COSTA, A. *et al.* Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, p.618-633, 2014.

de SOUSA, T. N. *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.

DE, S. L. *et al.* Progress towards the development of a *P. vivax* vaccine. **Expert Rev Vaccines**, v. 20, n. 2, p.97-112, 2021.

DEANE, L.M. *et al.* Estudios sobre la transmisión de la malaria símica y sobre una infección natural del hombre por *Plasmodium simium* en el Brasil .**Bol Oficina Sanit Panam**, v. 63, n. 2, p.100-5, 1967.

DEANE, L. M. *et al.* Studies on transmission of simian malaria and on the natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. **Bull World Health Organ**, v. 35, p. 805-808, 1966.

DEANE, L. M. Plasmodia of monkeys and malaria eradication in Brazil. **Rev Latinoam Microbiol Parasitol**, v.11, n. 2, p. 69-73, 1969 b.

DEANE, L. M. Simian malaria in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 87, Suppl 3, p. 1-20, 1992.

DEANE, L. M. Studies on simian malaria in Brazil. **Bull World Health Organ.**, v.31, n.5, p. 752-3, 1964.

DEANE, L.M. *et al.* Encontro do *Plasmodium brasilianum* em macacos do território federal do Amapá, Brasil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 11, p. 199-202, 1969a.

DEANE, L.M. Malaria studies and control in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 38, n. 2, p. 223-230, 1988.

DEL GIUDICE, G. *et al.* Antibody Responses to *Plasmodium Falciparum* and *P. Vivax* Sporozoites in areas with stable and unstable Malaria. Bull. **World Health Organ**, v. 68 Suppl, p. 191–196, 1990.

DEL PORTILLO, H. A. *et al.* Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, p. 4030–4, 1991.

DEMBELE, L. *et al.* Towards an in vitro model of *Plasmodium* hypnozoites suitable for drug discovery. **PLoS One**, v. 6, p. e18162, 2011.

DOMINGOS, MF; TUBAKI, RM; DI SANTI, SM. Malária no estado de São Paulo: 1975-2006. SUCEN 30 anos. **BEPA**, v. 3, Suppl. 1, p. 10–12, 2006.

DOTRÁRIO, A. B. *et al.* Malaria and other febrile diseases among travellers: the experience of a reference centre located outside the Brazilian Amazon Region. **Malar J**, v. 15, n. 1, p.294, 2016.

DRAPER, SJ *et al.* Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell Host Microbe*, v. 24, n. 1, p. 43-56, 2018.

DUARTE, A. M. *et al.* Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P.falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. **J Med Primatol**, v. 35, n. 2, p. 87-96, 2006.

DUVAL, L *et al.* African apes as reservoirs of *Plasmodium falciparum* and the origin and diversification of the *Laverania* subgenus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.107, p. 10561–6, 2011.

ESCALANTE, A. A. *et al.* Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. **Mol. Biol. Evol**, v. 12, p. 616-626, 1995.

ESCALANTE, A. A. *et al.* The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 14, p. 8124-9, 1998.

ESPINOSA, AM *et al.* Expression, polymorphism analysis, reticulocyte binding and serological reactivity of two *Plasmodium vivax* MSP-1 protein recombinant fragments. **Vaccine**, v. 21, n. 11-12, p. 1033-43, 2003.

ESPOSITO, F. *et al.* Immunity to *Plasmodium* Sporozoites: Recent Advances and Applications to Field Research. **Parassitologia**, v. 28, n. 2-3, p. 101–105, 1986.

ESTRADA, A, *et al.* Impending extinction crisis of the world's primates: why primates matter. **Science Advances**. v. 3, p. e1600946, 2017.

EU. On the protection of animals used for scientific purposes. in: Directive 2010/63/EU, 2010.

- FANDEUR, T. *et al.* Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. **Parasitology**, v. 120, n. Pt 1, p.11-21, 2000.
- FAUST, C. *et al.* Primate malarias: Diversity, distribution and insights for zoonotic *Plasmodium*. **One Health**, v. 1, p. 66–75, 2015.
- FIGUEIREDO, M. A. P. *et al.* Identification of *Plasmodium* spp. in Neotropical primates of Maranhense Amazon in Northeast Brazil. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0182905, 2017.
- FOLEGATTI, PM *et al.* A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. **Malar J.** v. 16, n. 1, p.107, 2017.
- FORATTINI, O. P. *et al.* Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 11–Biting activity and blood-seeking parity of *Anopheles* (*Kerteszia*) in south-eastern Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 30, p. 107–14, 1996.
- FOWKES, F. J. I.; BOEUF, P.; BEESON, J. G. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. **Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 139–153, 7 fev. 2016.
- FRANÇA, C. T. *et al.* Identification of highly-protective combinations of *Plasmodium vivax* recombinant proteins for vaccine development. **Elife**, v. 6, p. e28673, 2017.
- FRANÇA, C. T. *et al.* *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Proteins Are Key Targets of Naturally Acquired Immunity in Young Papua New Guinean Children. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n.9, p. e0005014, 2016.
- FRANKE, ED *et al.* S. Antibody response to the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in naturally infected humans. **Am J Trop Med Hyg.** v. 46, n. 3, p. 320-6, 1992.
- FUENTES-RAMÍREZ, A *et al.* Molecular Detection of *Plasmodium malariae*/*Plasmodium brasilianum* in Non-Human Primates in Captivity in Costa Rica. **PLOS ONE**. v.12, n. 1: p. e0170704, 2017.
- FUJIOKA, H *et al.* A nonhuman primate model for human cerebral malaria: rhesus monkeys experimentally infected with *Plasmodium fragile*. **Exp Parasitol.** v. 78, n. 4, p. 371-6, 1994.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. <https://www.sosma.org.br/causas/mata-atlantica/>. Acessado 03/05/2021 as 9:51.
- GALINSKI, MR. A reticulocyte-binding protein complex of *Plasmodium vivax* merozoites. **Cell.** v. 69, n. 7, p. 1213-26, 1992.
- GALINSKI, M. R; BARNWELL, J. W. Monkey malaria kills four humans. **Trends Parasitol**, v. 25, p. 200-204, 2009.
- GALLAND, G. G. Role of the squirrel monkey in parasitic disease research. **Inst. Anim. Lab. Res.** v. 41, p. 37-43, 2000.
- GATTO, D; BRINK, R. The germinal center reaction. **J Allergy Clin Immunol**, v. 126, n. 5, p. 898–907, 2010

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. 6183-90, 2010.

GERMANN, Anja *et al.* “Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function. **Cryobiology**. vol. 67, n. 2, p. 193-200, 2013.

GOEL, VK *et al.* Band 3 is a host receptor binding merozoite surface protein 1 during the *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 100, n. 9, p. 5164-9, 2003.

GOLDMAN, I. F *et al.* Circumsporozoite Protein Gene of *Plasmodium Simium*, a *Plasmodium Vivax*- Like Monkey Malaria Parasite. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 57, n. 1, p. 117-180. 1993.

GONDER, R; BERENBERG-GOSSLER, H. Untersuchungen über die malariaplasmodien der affen. **Malaria Leipzig**, p. 47–56, 1908.

GOOD, M. F. & DOOLAN, D. L. Immune effect mechanisms in malaria. **Current Opinion in immunology**, v.11, p. 412-419, 1999.

GOOD, M. F. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. **Trends in Parasitology**, v.21, p. 29-34, 2005.

GOZALO, A, *et al.* Prevalence of antibody to *Plasmodium falciparum* antigens among feral Saimiri monkeys in the Amazon basin region of Peru. **J Med Primatol**. V. 26, n. 4, p. 204-6, 1997.

GRIMBERG, B. T. *et al.* *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. **PLoS Med**, v. 4, n. 12, p. e337, 2007.

GU, Z; EILS, R; SCHLESNER, M. Complex Heatmaps Reveal Patterns and Correlations in Multidimensional Genomic Data. **Bioinf**, v. 32, n. 18, p. 2847–2849, 2016.

GUIMARÃES, AE, *et al.* Mosquitos (Diptera: Culicidae) ecology in the Iguaçu National Park, Brazil. 1. Habitat distribution. **Cad Saude Publica**, v. 19, p. 1107–1116, 2003.

GUIMARÃES, L. O. *et al.* The Genetic Diversity of *Plasmodium Malariae* and *Plasmodium Brasilianum* From Human, Simian and Mosquito in Brazil. **Acta Trop**, v. 124, n. 1, p. 27–32, 2012.

HE, W. Q. *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 Negl. Trop. Dis**, v. 13, n. 2, p. e0006987, 2019.

HERBERT, A. Malaria-like symptoms associated with a natural *Plasmodium reichenowi* infection in a chimpanzee. **Malar J**. v. 14, p. 220, 2015.

HERRERA, S *et al.* Aotus monkeys: their great value for anti-malaria vaccines and drug testing. **Int J Parasitol**, v. 32, p. 1625–35, 2002.

HERRERA, S. *et al.* Safety and elicitation of humoral and cellular responses in colobian malaria-naïve volunteers by a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v 73, n. 5, p. 3-9, 2005.

HESTER, J. *et al.* De Novo Assembly of a Field Isolate Genome Reveals Novel *Plasmodium Vivax* Erythrocyte Invasion Genes. **PLoS Negl. Trop. Dis**, v. 7, n. 1, p. e2569, 2013.

HILL, D. L. *et al.* Opsonising Antibodies to *P. falciparum* Merozoites Associated with Immunity to Clinical Malaria. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

HIRUNPETCHARAT, C *et al.* “Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1[19]) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4+ T cells.” **Journal of immunology**, v. 159, n. 7, p. 3400-11, 1997.

HIRUNPETCHARAT, C *et al.* “Intranasal immunization with yeast-expressed 19 kD carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein-1 (yMSP119) induces protective immunity to blood stage malaria infection in mice.” **Parasite immunology**, v. 20, n. 9 p. 413-20, 1998.

HOLDER, A. A., Blackman MJ. What is the function of MSP-I on the malaria merozoite? **Parasitol Today**, v. 10, n. 5, p. 182-4, 1994.

HOLDER, A. A. *et al.* “Merozoite surface protein 1, immune evasion, and vaccines against asexual blood stage malaria.” **Parassitologia**, v. 41,1-3, p. 409-14, 1999.

HUI, GS *et al.* Dominance of conserved B-cell epitopes of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein, MSP1, in blood-stage infections of naive Aotus monkeys. **Infect Immun**, v. 64, n. 5, p. 1502-9, 1996.

IMWONG, M. *et al.* Asymptomatic Natural Human Infections With the Simian Malaria Parasites *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium knowlesi*. **J Infect Dis**, v. 219, n. 5, p. 698-702, 2018.

JAMES, MA *et al.* Induction of protective immunity to *Plasmodium falciparum* in Saimiri sciureus monkeys with partially purified exoantigens. **Infect Immun**, v. 49, n. 3, p. 476-80, 1985.

JOICE, R. *et al.* *Plasmodium falciparum* transmission stages accumulate in the human bone marrow. **Sci Transl Med**, v. 6, n. 244, p. 244re5, 2014.

JONGWUTIWES, S. *et al.* *Plasmodium knowlesi* Malaria in humans and macaques, Thailand. **Emerg Infect Dis**, v. 17, p. 1799-1806, 2011.

JORDAN-VILLEGAS, A *et al.* Aotus lemurinus griseimembra monkeys: a suitable model for *Plasmodium vivax* sporozoite infection. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 73, n. 5 Suppl, p. 10-5, 2005.

JOYNER, CJ *et al.* Humoral immunity prevents clinical malaria during *Plasmodium* relapses without eliminating gametocytes. **PLoS Pathog**, v.15, n. 9, e1007974, 2019.

JOYNER, C. *et al.* *Plasmodium cynomolgi* infections in rhesus macaques display clinical and parasitological features pertinent to modelling vivax malaria pathology and relapse infections. **Malaria journal**, v. 15, n.1, p. 1–18, 2016.

JOYNER, C. J. *et al.* No More Monkeying Around: Primate Malaria Model Systems are Key to Understanding *Plasmodium vivax* Liver-Stage Biology, Hypnozoites, and Relapses. **Frontiers in microbiology**, n. 6, 145, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00145.

KAIN, KC *et al.* Circumsporozoite genotyping of global isolates of *Plasmodium vivax* from dried blood specimens. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 7, p. 1863-6, 1992.

KAIN, KC *et al.* Global distribution of a variant of the circumsporozoite gene of *Plasmodium vivax*. **J Infect Dis**. v. 164, n. 1, p. 208-10, 1991.

KAKOMA, I *et al.* Platelet kinetics and other hematological profiles in experimental *Plasmodium falciparum* infection: a comparative study between Saimiri and Aotus monkeys. **Kisaengchunghak Chapchi**, v. 30, n. 3, p. 177-82, 1992.

KALE, S. *et al.* Antibody Responses Within Two Leading *Plasmodium Vivax* Vaccine Candidate Antigens in Three Geographically Diverse Malaria-Endemic Regions of India. **Malar J**, v.18, n. 1, p. 425, 2019.

KANO, F. S. *et al.* *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: Baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. **Tropical Medicine and International Health**, v. 17, n. 8, p. 989– 1000, 2012.

KANO, F. S. *et al.* *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. **Tropical Medicine & International Health**, v. 17, n. 8, p. 989- 1000, 2012.

KANO, F. S. *et al.* The Presence, Persistence and Functional Properties of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. **Plos Negl Trop Dis**, v. 10, n. 12, p. e0005177, 2016.

KATO, K *et al.* Domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 15, p. 5552-7, 2005.

KING, C. L. *et al.* Biosignatures of Exposure/Transmission and Immunity. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 3_Suppl, p. 16–27, 2 set. 2015.

KING, C. L. *et al.* Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 24, p. 8363–8368, 2008.

KOCH, R. Professor Koch's Investigations on Malaria: Fourth Report to the Colonial Department of the German Colonial Office. **British medical journal**, v. 1, n. 2061, p. 1597–8, 30, 1900.

KRISHNAMURTY, A. T. *et al.* Somatic Hypermutated *Plasmodium*-Specific IgM+ Memory B Cells Are Rapid, Plastic, Early Responders upon Malaria Rechallenge. **Immunity**, v. 45, n. 2, p. 402–414, 2016.

KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 1, p. 1, 1985.

KROTOSKI, W. A. *et al.* Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. I. Discovery of a new latent form of *Plasmodium cynomolgi* (the hypnozoite), and failure to detect hepatic forms within the first 24 hours after infection. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 31, n. 1, p. 24–35, 1982.

KROTOSKI, W. A. *et al.* Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. II. The hypnozoite of *Plasmodium cynomolgi bastianellii* from 3 to 105 days after infection, and detection of 36- to 40-hour pre-erythrocytic forms. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 31, p. 211–225, 1982.

KUSI, KA *et al.* Anti-sporozoite antibodies as alternative markers for malaria transmission intensity estimation. **Malar J**, v. 13, p. 03, 2014.

KUSI, KA *et al.* Seroprevalence of Antibodies against *Plasmodium falciparum* Sporozoite Antigens as Predictive Disease Transmission Markers in an Area of Ghana with Seasonal Malaria Transmission. **PLoS One**, v. 11, n. 11, p. e0167175, 2016.

LALREMRUATA, A, *et al.* Species and genotype diversity of *Plasmodium* in malaria patients from Gabon analysed by next generation sequencing. **Malar J**, v. 16, n. 1, p. 398, 2017.

LALREMRUATA, A. *et al.* Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. **EBioMedicine**, v. 2, n. 9, p. 1186-92, 2015.

LANGERMANS, J A *et al.* Reactivity of human T-lymphocyte-specific antibodies with peripheral blood mononuclear cells and spleen of *Aotus azarae* ssp. *boliviensis* (owl monkey). **Journal of medical primatology**, v. 29, n. 6, p. 397-401, 2000.

LANGHORNE, J; COHEN, S. *Plasmodium knowlesi* in the marmoset (*Callithrix jacchus*). **Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 67-76, 1979.

LANGHORNE, J. *et al.* Immunity to malaria: more questions than answers. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 725–732, 2008.

LECLERC, M. *et al.* Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. **Parasitology**, v. 129, p. 677-684, 2004.

LIM, C. *et al.* *Plasmodium vivax*: recent world expansion and genetic identity to *Plasmodium simium*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, p. 15523-15528, 2005.

LING, IT; OGUN, SA; HOLDER, AA. Immunization against malaria with a recombinant protein. **Parasite Immunol**, v.16, n. 2, p. 63-7, 1994.

LING, I T *et al.* Immunization against malaria with a recombinant protein. **Parasite immunology**. vol. 16, n. 2, p. 63-7, 1994.

LIU, W. *et al.* Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. **Nature**, v. 467, p. 420-425, 2010.

- LO, E. *et al.* Molecular epidemiology of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria among Duffy-positive and Duffy-negative populations in Ethiopia. **Malar J**, v. 14, p. 84, 2015.
- LONGLEY, RJ *et al.* Development and validation of serological markers for detecting recent *Plasmodium vivax* infection. **Nat Med**, v. 26, n. 5, p. 741-749, 2020.
- LONGLEY, R. J.; SATTABONGKOT, J.; MUELLER, I. Insights into the naturally acquired immune response to *Plasmodium vivax* malaria. **Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 154–170, 2016.
- LORENZ, C. *et al.* Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. **Mal. J**, v. 14, p.408, 2015.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R; DEANE, L. M. Simian malaria at two sites in the Brazilian Amazon. I - The infection rates of *Plasmodium brasilianum* in non-human primates. **Mem Inst Osw Cruz**, v. 90, n. 3, p. 331-339, 1995.
- LOVER, A. A. *et al.* Malaria Elimination: Time to Target all Species. **Am J Trop Med Hyg**, v. 99, n. 1, p. 17-23, 2018.
- LUCHAVEZ, J. *et al.* Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. **Emerg Infect Dis**, v. 14, p. 811-813, 2008.
- LUGLI, E. *et al.* “Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells.” **Nature protocols**, vol. 8, n. 1, p. 33-42, 2013.
- MACHADO, R. L. D; PÓVOA, M. M. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247, na P. vivax-like) in three endemic areas of Amazonian Brazil and their correlation with chloroquine-treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, p. 377-381, 2000.
- MAKANGA B, *et al.* Phase 1 study of two merozoite surface protein 1 (MSP1(42)) vaccines for *Plasmodium falciparum* malaria. **PLoS Clin Trials**. v. 2, n. 4, p. e12, 2007.
- MALLERET, B. *et al.* *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. **Blood**, v. 125, n. 8, p.1314-24, 2015.
- MARQUES, G. R. A. M. *et al.* Aspectos epidemiológicos da malária autóctone na mata atlântica, litoral norte, estado de São Paulo, 1985-2006. **Ver Soc Bras Med Trop**, v.41, p. 386-389, 2008.
- MARTINELLI, A; CULLETON, R. Non-human primate malaria parasites: out of the forest and into the laboratory. **Parasitology**, v. 145, n. 1, p. 41-54, 2018.
- MAYOR, A; ALANO, P. Bone marrow reticulocytes: a *Plasmodium vivax* affair? **Blood**, v. 125, n. 8, p. 1203-5, 2015.
- McGREGOR, I. A. *et al.*, Treatment of East African *P. falciparum* malaria with west African human gamm-globulin. **Trasnaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, p. 170- 175, 1963.

MEDEIROS, C. M. P. *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.

MEIBALAN E, Marti M. Biology of Malaria Transmission. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 7, n. 3, a025452, 2017. doi:

MENARD, D. *et al.* *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 13, p. 5967- 71, 2010.

MICHON, P; FRASER, T; ADAMS, JH. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Infect Immun**, v. 68, n. 6, p. 3164-71, 2000.

MIGOT, F *et al.* Humoral and cellular immune responses to the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in Madagascar. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 48, n. 4, p. 524–529. 1993. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1993.48.524>

MIGUEL, R. B. Estudo da infecção humana por *Plasmodium* spp no município de Guapimirim, estado do Rio de Janeiro. **MsD thesis**. Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz; 2011.

MILLER, L. H *et al.* The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673-9, 2002. doi:10.1038/415673^a

MILLER, L. H. *et al.* The Resistance Factor to *Plasmodium vivax* in Blacks. **New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 6, p. 302–304, 1976.

MILLET, P. *et al.* *Plasmodium ovale*: observations on the parasite development in Saimiri monkey hepatocytes in vivo and in vitro in contrast with its inability to induce parasitemia. **Exp. Parasitol**, v. 78, p. 394–399, 1994b.

MINISTERIO DA SAÚDE a (SVS/MS, 2022a). Epidemiological Report – Malaria 2022. Boletim Epidemiológico. n Especial Brasília, DF, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde (2020). URL: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no17.pdf> [Acessado em: 2 de fevereiro de 2023]

MINISTERIO DA SAÚDE b (SVS/MS, 2022b). Epidemiological Report – Malaria 2022. Boletim Epidemiológico. n Especial Brasília, DF, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde (2020). URL: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no30.pdf/view> [Acessado em: 2 de fevereiro de 2023]

MITCHELL, G. H. *et al.* Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. **Infection and Immunity**, v.72, p.154-158, 2004

MONTEIRO, E. F. *et al.* Naturally Acquired Humoral Immunity Against Malaria Parasites in Non-Human Primates From the Brazilian Amazon, Cerrado and Atlantic Forest. **Pathogens**, v. 9, n.7, p. 525, 2020.

MORAIS, CRISTIANE G *et al.* IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. *Parasitology research*, v. 95, n. 6., p. 420-6, 2005. doi:10.1007/s00436-005-1314-x

MOUNT, A. M *et al.* Impairment of humoral immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in pregnancy by HIV infection. *Lancet*, v. 363, n. 9424, p. 1860-7, 2004. doi:10.1016/S0140-6736(04)16354-X

MOURÃO, Luiza Carvalho *et al.* Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* blood-stage vaccine candidates (PvMSP-1₁₉ and PvMSP-3 $\alpha_{359-798}$ and their relationship with hematological features in malaria patients from the Brazilian Amazon. *Microbes and infection*, v. 14, n. 9, p. 730-739, 2012.

MOURIER, Tobias *et al.* The genome of the zoonotic malaria parasite *Plasmodium simium* reveals adaptations to host switching. *BMC biology*, v. 19,1 n. 219, 2021, doi:10.1186/s12915-021-01139-5

MOYES, C. L. *et al.* Defining the geographical range of the *Plasmodium knowlesi* reservoir. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, n. 3, 2014.

MUELLER, I *et al.* Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*, v. 9, n. 9, p. 555-66, 2009. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70177-X.

MUELLER, I. *et al.* Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*, v. 9, n. 9, p. 555-66, 2009.

MUELLER, I. *et al.* Natural Acquisition of Immunity to *Plasmodium vivax*. **Epidemiological Observations and Potential Targets**. [s.l.] Elsevier, 2013a. v. 81

MUELLER, I. *et al.* Natural Acquisition of Immunity to *Plasmodium vivax*. **Adv Parasitol**, v. 81, p. 77-131, 2013. doi: 10.1016/B978-0-12-407826-0.00003-5.

MUELLER, I.; SHAKRI, A. R.; CHITNIS, C. E. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. **Vaccine**, v. 33, n. 52, p. 7489–7495, 2015.

MULTINI LC, *et al.* Increasing Complexity Threatens the Elimination of Extra-Amazonian Malaria in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 35, n. 6, p. 383-387, 2019. doi: 10.1016/j.pt.2019.03.009.

MURUNGI, L. M. *et al.* A threshold concentration of anti-merozoite antibodies is required for protection from clinical episodes of malaria. **Vaccine**, v. 31, n. 37, p. 3936–3942, ago. 2013.

NARUM, DL *et al.* Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2899-906, 2000.

NAYAR, JK *et al.* Studies on a primaquine-tolerant strain of *Plasmodium vivax* from Brazil in Aotus and Saimiri monkeys. *J Parasitol*, v. 83, n. 4, p. 739-45, 1997. PMID: 9267419.

NG, O.T. *et al.* Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. **Emerg Infect Dis**, v. 14, p. 814-816, 2008.

NICOLETE, V. C. *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, 2016.

NISHIMOTO, Y *et al.* Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. **Mol Phylogenet Evol**, v. 47, n. 1, p. 45-53, 2008. doi: 10.1016/j.ympev.2008.01.031. 2008.

NÓBREGA DE SOUSA, T.; CARVALHO, L. H.; ALVES DE BRITO, C. F. Worldwide Genetic Variability of the Duffy Binding Protein: Insights into *Plasmodium vivax* Vaccine Development. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e22944, 2 ago. 2011.

NOGARO, SI *et al.* The breadth, but not the magnitude, of circulating memory B cell responses to *P. falciparum* increases with age/exposure in an area of low transmission. **PLoS One**, v. 6, n. 10, e25582, 2011.

NOTHDURFT, HD *et al.* Seroconversion to circumsporozoite antigen of *Plasmodium falciparum* demonstrates a high risk of malaria transmission in travelers to East Africa. **Clin Infect Dis**, v. 28, n. 3, p. 641-642, 1999.

NTUMNGIA, F. B. *et al.* A Novel Erythrocyte Binding Protein of *Plasmodium vivax* Suggests an Alternate Invasion Pathway into Duffy-Positive Reticulocytes. **mBio**, v. 7, n. 4, p. e01261-16, 2016.

NUNES, A. J. D. *et al.* *Plasmodium* infection and its association with biochemical and haematological parameters in free-living *Alouatta guariba clamitans* (Cabrera, 1940) (Primates: Atelidae) in Southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 114, p. e190210, 2020.

O'DONNELL, R. A. *et al.* Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-119 are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 12, p. 1403–1412, 2001.

OBALDIA, N. 3rd, *et al.* Evaluation of artemisone combinations in Aotus monkeys infected with *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n. 8, p. 3592-4, 2009.

OBALDIA, N. 3rd. *et al.* Bone Marrow Is a Major Parasite Reservoir in *Plasmodium vivax* Infection. **MBio**, v. 9, n. 3, 2018.

OFFICE, H. Report of the Animal Procedures Committee for 1997, 1998.

OLIVEIRA, M. R. F. *et al.* Cost-effectiveness of diagnostic for malaria in Extra-Amazon Region, Brazil. **Malr J**, v.11, p.390, 2012.

OLIVEIRA, T. C *et al.* Ongoing host-shift speciation in *Plasmodium simium*. **Trends in parasitology**, v. 37, n. 11, p. 940-942, 2021. doi:10.1016/j.pt.2021.08.005. (a)

OLIVEIRA, T. C *et al.* *Plasmodium simium*: Population Genomics Reveals the Origin of a Reverse Zoonosis. **The Journal of infectious diseases**. vol. 224, v. 11, p. 1950-1961, 2021. (b)

- OLIVEIRA-FERREIRA, J *et al.* Malaria in Brazil: an overview. **Malar J**, v. 9, p. 115, 2010.
- OSIER, FH *et al.* Opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. **BMC Med**, v. 12, 108, 2014. doi: 10.1186/1741-7015-12-108
- OWEN, Rachel E *et al.* Loss of T cell responses following long-term cryopreservation. **Journal of immunological methods**, v. 326, n. 1-2, p. 93-115, 2007. doi:10.1016/j.jim.2007.07.012
- OZWARA, H. *et al.* Heterologous promoter activity in stable and transient *Plasmodium knowlesi* transgenes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 130, p. 61–4, 2003.
- PACHECO, M. A. *et al.* Malarial parasite diversity in chimpanzees: the value of comparative approaches to ascertain the evolution of *Plasmodium falciparum* antigens. **Malar J**, v.12, p. 328, 2013.
- PARK, J W *et al.* “Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea.” **Clinical and diagnostic laboratory immunology**. vol. 8, n. 1, p. 14-20, 2001.
- PASINI, E. *et al.* An improved *Plasmodium cynomolgi* genome assembly reveals an unexpected methyltransferase gene expansion. **Wellcome Open Res**, v. 2, p. 42, 2017.
- PASINI, E. M; KOCKEN, C. H. M. Parasite-Host Interaction and Pathophysiology Studies of the Human Relapsing Malaria *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* Infections in Non-Human Primates. **Front. Cell. Infect. Microbiol**, v10, p. 614122, 2021.
- PATGAONKAR, M. *et al.* Vivax infection alters peripheral B-cell profile and induces persistent serum IgM. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 10, p. e12580, out. 2018.
- PEREIRA, V. A *et al.* Evaluating Seroprevalence to Circumsporozoite Protein to Estimate Exposure to Three Species of *Plasmodium* in the Brazilian Amazon. **Infect. Dis. Poverty**, v.7, n. 1, p. 46, 2018.
- PETTER, M.; DUFFY, M. F. Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. **Annu Rev Microbiol**, v. 62, p. 445-470, 2008. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093134.
- PETTER M, DUFFY MF. Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. **Results Probl Cell Differ**, v. 57, p. 47-90, 2015.
- PIRES, C. V. *et al.* Blood-stage *Plasmodium vivax* antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0207244, nov. 2018.
- PITCHER, C. J *et al.* Development and homeostasis of T cell memory in rhesus macaque. **Journal of immunology**, v. 168, n. 1, p. 29-43, 2002. doi:10.4049/jimmunol.168.1.29
- PITTENDRIGH, C. S. The bromeliad-Anopheles-malaria complex in Trinidad; the bromeliad flora. **Evolution**, v. 2, n. 1, p. 58-89, 1948.

PIZARRO, JC *et al.* Crystal structure of a Fab complex formed with PfMSP1-19, the C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*: a malaria vaccine candidate. **J Mol Biol**, v. 328, n. 5, p. 1091-103, 2003.

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

POUVELLE, B; GYSIN, J. Presence of the parasitophorous duct in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* parasitized Saimiri monkey red blood cells. **Parasitol. Today**, v. 13, p. 357–361, 1997.

PRABA-EGGE, A. D. *et al.* Cytokine responses during acute simian *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium knowlesi* infections. **Am. J. Trop. Med**, v. 67, p. 586-596, 2002.

PRABA-EGGE, A. D. *et al.* Cytokine responses during acute simian *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium knowlesi* infections. **Am. J. Trop. Med**, v. 67, p. 586-596, 2002.

PRATT-RICCIO, L.R *et al.* Synthetic Antigens Derived from *Plasmodium falciparum* Sporozoite, Liver, and Blood Stages: Naturally Acquired Immune Response and Human Leukocyte Antigen Associations in Individuals Living in a Brazilian Endemic Area. . **Am. J. Trop. Med**, v. 97, n. 5, p. 1581-1592, 2017. doi:10.4269/ajtmh.17-0359

PRUGNOLLE, F. *et al.* African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, p.1458-1463, 2010.

PRUGNOLLE, F. *et al.* African monkeys are infected by *Plasmodium falciparum* nonhuman primate-specific strains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.108, p.11948–53, 2010.

QARI, SH *et al.* Polymorphism in the circumsporozoite protein of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 55, n. 1-2, p. 105-13, 1992.

QARI, S. H. *et al.* Identification of *Plasmodium vivax-like* human malaria parasite. **Lancet**. v. 341, n. 8848, p.780-3, 1993.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing (Vienna, Austria). <http://www.r-project.org/index.html>, 2020 (acessado em 10, 2021).

RANJAN, A; CHITNIS, CE. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 24, p. 14067-72, 1999.

RIBEIRO MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biol Conserv**, v. 142, p. 1141–1153, 2009.

RICCIO, Evelyn K P *et al.* Cellular and humoral immune responses against the *Plasmodium vivax* MSP-1₁₉ malaria vaccine candidte in individuals living in an endemic area in north-eastern Amazon region of Brazil.” **Malaria journal**, v. 12, 326, 2013, doi:10.1186/1475-2875-12-326

- RICHARDS, J; MUELLER, I. Identifying the risks for human transmission of *Plasmodium* knowlesi. **Lancet Planet Health**, v. 1, n. 3, p. e83-e85, 201.
- RODHAIN, J. Paradoxical behaviour of *Plasmodium vivax* in the chimpanzee. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 1956 May;50(3):287-93.
- RODRIGUES, MH *et al.* Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. **Malar J**. v. 2, n. 1, p. 39, 2003.
- RODRIGUES, MH *et al.* Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **Int J Parasitol**, v. 35, n. 2, p. 85-92, 2005.
- RODRIGUES, PT *et al.* Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 1993, 2018.
- ROESCH, C *et al.* Genetic diversity in two *Plasmodium vivax* protein ligands for reticulocyte invasion. **PLoS Negl Trop Dis**, v.12, n. 10, e0006555, 2018.
- ROSENBERG, R. *et al.* Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Science**, v. 245, n. 4921, p.973-6, 1989.
- ROSSAN, R. N. *et al.* Demonstration of exoerythrocytic stages of *Plasmodium vivax* in Saimiri sciureus. **Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg**, v.69, p. 471– 472, 1975.
- RYAN, J. R. *et al.* Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. **Am J Trop Med Hyg**, v. 75, n. 4, p. 575-81, 2006.
- SABCHAREON, A. *et al.* Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. **Am J Trop Med Hyg**, v. 45, n. 3, p. 297–308, 1991.
- SAMPATH, S. *et al.* Glycan masking of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein for probing protein binding function and vaccine development. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 6, p. e1003420, 2013.
- SANTOS, E. *et al.* VK210 and VK247 Genotypes of *Plasmodium Vivax* in Anopheline Mosquitoes From Brazilian Amazon. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 1, p. 9391, 2019.
- SARALAMBA, N. *et al.* Genetic polymorphisms in the circumsporozoite protein of *Plasmodium malariae* show a geographical bias. **Malaria journal**, v.17, n.1, p.269. 2018.
- SATCHWELL, T. J. Erythrocyte invasion receptors for *Plasmodium falciparum*: new and old. **Transfusion Medicine**, v. 26, n. 2, p. 77–88, abr. 2016.
- SCHERF, A.; LOPEZ-RUBIO, J. J.; RIVIERE, L. Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 445–470, 2008.
- Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Malária 2020. Número especial, Novembro de 2020.
- SEED, T. M. *Plasmodium Simium*: Ultrastructure of Erythrocytic Phase. **Exp. Parasitol**, v. 39, n. 2, p. 262–276, 1976.

SEIDELIN, H. Notes on Some Blood-Parasites in Man and Mammals. **Ann.Trop. Med. Parasitol**, v. 5, n. 4, p.501–508, 1912.

SHAW-SALIBA, K *et al.* Insights into an Optimization of *Plasmodium vivax* Sal-1 In Vitro Culture: The Aotus Primate Model. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10,7 e0004870, 2016,

SILVA, WGS *et al.* Relief influence on the spatial distribution of the Atlantic Forest cover at the Ibiúna Plateau, SP. **Braz J Biol**, v. 67, p. 403–411, 2007.

SILVA-FILHO, J. L., *et al.* *Plasmodium Vivax* in Hematopoietic Niches: Hidden and Dangerous. **Trends Parasitol**, v. 36, n. 5, p. 447–458, 2020.

SILVEIRA, ELV; DOMINGUEZ, MR; SOARES IS. To B or Not to B: Understanding B Cell Responses in the Development of Malaria Infection. **Front Immunol**, v. 9, 2961, 2018.

SINDEN, RE. Sexual development of malarial parasites. **Adv Parasitol**, v. 22, p. 153-216, 1983. doi: 10.1016/s0065-308x(08)60462-5.

SINGH, AP, *et a.* *Plasmodium* circumsporozoite protein promotes the development of the liver stages of the parasite. **Cell**, v. 131, n. 3, p. 492-504, 2007.

SINGH, B. *et al.* A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet**, v. 363, p. 1017-1024, 2004.

SINNI, P; SIM, K. B. Cell invasion by the vertebrate stages os *Plasmodium*. **Treands in Microbiology**, v. 5, p. 52- 58, 1997.

SIQUEIRA, A. M. *et al.* *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: scenario and challenges. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, 6 suppl, p. 87–96, 2016.

SNOUNOU, G *et al.* Le paludisme chez les hominidés. **Bull Acad Natl Med**, v. 195, n. 8, p. 1945-1954, 2011.

SNOUNOU, G. *et al.* Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. **Mol Biochem Parasitol**, v. 58, p283-292. 1993.

SOARES, I S *et al.* “Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria.” **Infection and immunity**, v. 65, n. 5, p.1606-14, 1997.

SOARES, I S *et al.* “Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil.” **Acta tropica**. vol. 72,1 p. 13-24, 1999.

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. **Mol Biochem Parasitol**, v. 146, n. 2, p. 251-4, 2006.

SOUSA, T. N. *et al.* Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in brazilian *Plasmodium vivax* populations. **Mal J**, v. 9, p. 334, 2010.

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, 2014.

SOUZA-SILVA, F. A. *et al.* Naturally acquired antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein (DBP) in rural Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p. 185–193, 2010.

SRINIVASAN, P. *et al.* Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 32, p. 13275- 80, 2011.

STOKES, S. W. *et al.* Acute clinical malaria *P. inui* in a cynomolgus monkey *Macaca fascicularis*. **Lab Anim Sci**, v. 33, n. 1, p.81-5,1983.

STONE, SL; LUND, FE. IgM Memory Cells: First Responders in Malaria. **Immunity**, v. 45, n.2, p. 235-7. 2016.

STORTI-MELO, LM *et al.* *Plasmodium vivax* circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 103, n. 7, p. 672-678, 2009.

STRUIK, S. S; RILEY, E. M. Does malaria suffer from lack of memory? **Immunological Reviews**, v. 201, p. 268-290, 2004.

STURM, A. *et al.* Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p.1287-90, 2006.

SULLIVAN, J. S., *et al.* Adaptation of a strain of *Plasmodium vivax* from India to New World monkeys, chimpanzees, and anopheline mosquitoes. **J. Parasitol**, v. 87, p. 1398–1403, 2001.

TA, T. H. *et al.* First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malar J**, v. 13, p. 68, 2014.

TAKALA, S. L; PLOWE, C. V. Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: Preventing and overcoming “vaccine resistant malaria”. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 9, p. 560–573, 2009.

TALIAFERRO, W. H; TALIAFERRO, L. G. Morphology, periodicity and course of infection of *Plasmodium brasilianum* in Panamanian monkey, **Amer. J. Hyg**, v. 21, p. 1, 1934.

TALIAFERRO, W. H. Experimental studies on the malaria of monkey. **Amer. J. Hyg**, 16, p. 429, 1932.

TANOMSING, N *et al.* Genetic analysis of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from geographically diverse isolates of *Plasmodium* malariae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 10, p. 3523-3530, 2007.

TAPCHAISRI, P. *et al.* Antibodies Against Malaria Sporozoites in Patients With Acute Uncomplicated Malaria and Patients With Cerebral Malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 34, n. 5, p. 831–836, 1985.

TAZI, L; AYALA, F. J. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. **Infect Genet Evol**, v. 11, p. 209-221, 2011.

THAM, WH; BEESON, JG; RAYNER, JC. *Plasmodium vivax* vaccine research - we've only just begun. **Int J Parasitol**, v. 47, n. 2-3, p. 111-118, 2017.

THAM, W. H. *et al.* *Plasmodium vivax* vaccine research - we've only just begun. **Int J Parasitol**, v.47, n. 2-3, p. 111-118, 2017. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.09.006.

THOMAS, A.W. *et al.* The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 13, n. 2, p. 187-99, 1984.

THOMAS, A. W. *et al.* High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme-linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. **Am J Trop Med Hyg**, v. 51, n. 6, p. 730-40, 1994.

TORRES, Letícia de Menezes. Antígenos envolvidos na invasão dos reticulócitos pelo *Plasmodium vivax*: variabilidade genética do hospedeiro vertebrado e modulação da resposta imune humoral . 2017. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências - Concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias)-Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2017.

TRIGLIA, T *et al.* Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. **Mol Microbiol**, v. 38, n. 4, p. 706-718, 2000.

TSUBOI, T *et al.* Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein. **Infect Immun**, v. 62, n. 12, p. 5581-5586, 1994.

TUTTERROW, YL *et al.* High Avidity Antibodies to Full-Length VAR2CSA Correlate with Absence of Placental Malaria. **PloS One**, v. 7, n. 6, e40049, 2012.

VALENZUELA, NM; SCHAUB, S. The Biology of Igg Subclasses and Their Clinical Relevance to Transplantation. **Transplantation**, v. 102, Suppl 1, S7–13, 2018.

VAN DEN EEDE, P. *et al.* Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. **Malar J**, v. 8, p. 249, 2009.

VANBUSKIRK, K, *et al.* Antigenic drift in the ligand domain of *Plasmodium vivax* duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. **J Infect Dis**, v.190, p.1556-1562, 2004.

VANBUSKIRK, K. M. *et al.* Antigenic frift in the ligant domain of *Plasmodium vivax* duffy binding protein confers resistance to inhibitory antibodies. **J Infect Dis**, v. 190, p. 556-562, 2004.

VICENTIN, E. 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.

VIDARSSON, G; DEKKERS, G, RISPENS, T. IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. **Front Immunol**, v. 5, p. 520, 2014.

VLACHOU, D. *et al.* Real-time, in vivo analysis of malaria ookinete locomotion and mosquito midgut invasion. **Cell Microbiol**, v. 6, n. 7, p. 671-85, 2004.

VLACHOU, D. *et al.* The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. **Curr Opin Genet Dev**, v. 16, n. 4, p. 384-91, 2006.

VOLNEY, B. *et al.* A Sero-Epidemiological Study of Malaria in Human and Monkey Populations in French Guiana. **Acta Trop**, v. 82, n. 1, p. 11–23, 2002.

VOORBERG-VAN, der W. A. *et al.* Transgenic fluorescent *Plasmodium cynomolgi* liver stages enable live imaging and purification of malaria hypnozoite-forms. **PLoS One**, v.8, p. e54888, 2013.

VYTHILINGAM, I *et al.* *Plasmodium knowlesi* in humans, macaques and mosquitoes in peninsular Malaysia. **Parasit Vectors**, v. 1, n. 1, p. 26, 2008.

WANG, LT *et al.* A Potent Anti-Malarial Human Monoclonal Antibody Targets Circumsporozoite Protein Minor Repeats and Neutralizes Sporozoites in the Liver. **Immunity**, v. 53, n. 4. p. 733-744.e8. 2020.

WARDEMANN, H; MURUGAN, R. From human antibody structure and function towards the design of a novel *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein malaria vaccine. **Curr Opin Immunol**, v. 53, p. 119-123, 2018. doi: 10.1016/j.coi.2018.04.023.

WATERS, AP *et al.* A merozoite receptor protein from *Plasmodium knowlesi* is highly conserved and distributed throughout *Plasmodium*. **J Biol Chem**, v. 265, n. 29., p. 17974-17949, 1990.

WENGELNIK, K, *et al.* A class of potent antimalarials and their specific accumulation in infected erythrocytes. **Science**, v. 295, n. 5558, p. 1311-4, 2002.

WERTHEIMER, S. P.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax* interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: identification of a parasite receptor-like protein. **Exp Parasitol**, v. 69, n. 4, p. 340-50, 1989.

WHITE, N. J. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v. 10, 297, 2011.

WHITE, N. J. *et al.* Malaria. **Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723–35, 2014.

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. **Clin Infect Dis**, v. 46, p.172-173, 2008.

WHO. World malaria Report 2020. Geneva, World Health Organization, 2020.

WHO. World Malaria Report. Geneva 2022. URL: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022> [acessado em: 10 de Janeiro de 2023.]

WICKRAMARACHCHI, T, *et al.* Comparison of naturally acquired antibody responses against the C-terminal processing products of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. **International journal for parasitology**. vol. 37, n. 2, p. 199-208, 2007.

WICKRAMARACHCHI, T. *et al.*, Comparison of naturally acquired antibody responses against the C- terminal processing products of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein – 1 under low transmission and unstable malaria condition in Sri Lanka. **Int Journal Parasitol**, v. 37, p. 199-208, 2007.

WIRTZ, RA *et al.* Prevalence of antibody to heterologous circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in Thailand. **Lancet**, v. 336, n. 8715, p. 593-5, 1990.

World Health Organisation. Malaria Vaccine Rainbow Tables (2013). Available from: http://www.who.int/vaccine_research/links/Rainbow/en/index.html

XAINLI, J. *et al.* Epitope-specific humoral immunity to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 2508-251, 2003.

YAMASAKI, T *et al.* Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? **Acta Trop**, v. 107, p. 179-185, 2008.

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**. vol. 67, n. 1, p. 342-9, 1999.

YANG, Jun *et al.* The effects of storage temperature on PBMC gene expression. **BMC Immunology**, v. 17, 6, 2016.

YE, Z; VAN DYKE, K; ROSSAN, RN. Effective treatment with a tetrandrine/chloroquine combination for chloroquine-resistant *falciparum* malaria in Aotus monkeys. **Malar J**. v. 12, n. 117, 2013.

YLOSTALO, J. *et al.* Transcriptome profiles of host gene expression in a monkey model of human malaria. **J Infect Dis**, v. 191, p. 400–9, 2005.

YOUNG, M.D; BAERG, D.C; ROSSAN, R.N. Parasitological review. Experimental monkey hosts for human plasmodia. **Parasitol**, v. 38, n. 1, p. 136-52, 1975.

YUSOF, R., *et al.* High proportion of knowlesi malaria in recent malaria cases in Malaysia. **Malar J**, v. 13, p. 168, 2014.

ZAKERI, S. *et al.* Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical *Plasmodium vivax* isolates from Iran. **Tropical Medicine and International Health**, v. 2, p. 729-737, 2006.

ZHU, H. M. *et al.* Human natural infection of *Plasmodium knowlesi*. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, v. 24, p. 70-71, 2006.

ZIELER, H; DVORAK, JA. Invasion *in vitro* of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 97, n. 21, p. 11516-21, 2000.

ANEXOS

I. COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO

Your manuscript submission - 1169552

De: Frontiers in Cellular and Infection Microbiology Editorial Office (cellandinfect.editorial.office@frontiersin.org)

Para: gabriela_biomed@yahoo.com.br

Data: domingo, 19 de fevereiro de 2023 às 12:20 BRT

Dear Dr Pereira de Assis

We are pleased to inform you that we have received the manuscript "IgM antibodies response against Plasmodium antigens in neotropical primates in the Brazilian Atlantic Forest" to be considered for publication in Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, section Parasite and Host.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:

<https://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

Your manuscript is now in the initial validation stage to determine its suitability for peer review. Should your manuscript be sent out for peer review, you will receive a notification once we receive the reports from reviewers and the interactive review forum is activated. You will then be able to read the review reports and exchange directly with the reviewers in the interactive review forum as well as submit a revised manuscript, if appropriate. If the required number of reviewers endorse your manuscript in the Independent Review stage, their tabs will be closed and the manuscript will be forwarded to the Review Finalized stage, where you will be able to interact with the handling editor via the Editor tab.

Best regards,

Your Frontiers in Cellular and Infection Microbiology Team,

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team

www.frontiersin.org

Avenue du Tribunal Fédéral 34

1005 Lausanne Switzerland

For technical issues please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us)

-----MANUSCRIPT DETAILS-----

Manuscript title: IgM antibodies response against Plasmodium antigens in neotropical primates in the Brazilian Atlantic Forest

Manuscript ID: 1169552

Authors: Gabriela Maíra Pereira de Assis, Denise Anete Madureira de Alvarenga, Luisa Braga e Sousa, Juan Camilo Sánchez-Arcila, Eduardo Fernandes e Silva, Anielle Pina-Costa, Gustavo Henrique Pereira Gonçalves, Júlio César de Souza Junior, Ana Júlia Dutra Nunes, Alcides Pissinatti, Silvia Bahadian Moreira, Letícia Torres, Helena Lott Costa, Herlandes da Penha Tinoco, Valéria do Socorro Pereira, Irene da Silva Soares, Tafs Nóbrega de Sousa, Francis Babila Ntumngia, John H Adams, Flora Satiko Kano, Zelinda Maria Braga Hirano, Lilian Rose Pratt-Riccio, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro, Joseli Oliveira Ferreira, Luzia Helena Carvalho and Cristiana Ferreira Alves De Brito

Journal: Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, section Parasite and Host

Article type: Original Research

Submitted on: 19 Feb 2023

-----ADDITIONAL INFORMATION-----

In order to enable a smooth and efficient review process, please familiarize yourself with the Frontiers review guidelines:

https://www.frontiersin.org/Journal/ReviewGuidelines.aspx?s=1861&name=parasite_and_host

To take part in the Resource Identification Initiative please cite antibodies, genetically modified organisms, software tools, data, databases and services using the corresponding catalog number and RRID in the text of your article. Please see here for more information: https://www.frontiersin.org/files/pdf/letter_to_author.pdf

You are receiving this email regarding ongoing activities you have with Frontiers. If you think this was wrongly sent to you, please contact our support team at support@frontiersin.org

II. AUTORIZAÇÕES DO SISBIO



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 28953-1	Data da Emissão: 06/06/2011 15:34
Dados do titular	
Nome: Julio Cesar de Souza Junior	CPF: 004.957.679-80
Título do Projeto: BUSCA DE MARCADORES MOLECULARES PARA A DIFERENCIAÇÃO ESPÉCIE-ESPECÍFICA DE PLASMÓDIOS DE PRIMATAS NÃO-HUMANOS?	
Nome da Instituição : MUN DE INDAIAL	CNPJ: 63.102.798/0001-00

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	colheita e envio de material biológico	07/2011	07/2011
2	processamento e análise das amostras	08/2011	08/2012
3	publicação dos dados	09/2011	12/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal, cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Daniela Camargos Costa	Pesquisadora	063.735.836-86	MG10783684 SSP-MG	Brasileira
2	Vanessa Pecini da Cunha	Pesquisadora	064.945.179-19	4831341 SSP-SC	Brasileira
3	Cristiana Ferreira Alves de Brito	Pesquisadora	682.133.796-91	M-3.989.353 SSP-MG	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	INDAIAL	SC	Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Atelidae

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 22947186



Página 1/3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 43375-4	Data da Emissão: 16/02/2016 11:22	Data para Revalidação*: 17/03/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Ana Júlia Dutra Nunes	CPF: 020.154.080-02
Título do Projeto: Estudo da ecologia, comportamento e saúde de bugio-ruivo (<i>Alouatta clamitans</i> Cabrera, 1940) em Joinville, Santa Catarina, Brasil.	
Nome da Instituição: CONDOMÍNIO PERINI BUSINESS PARK	CNPJ: 05.600.443/0001-37

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Censo e densidade de animais	10/2014	03/2015
2	Avaliar a qualidade do fragmento	01/2015	06/2015
3	Coleta de material e análise genética	01/2015	12/2016
4	Coleta de material e pesquisa de zoonoses	01/2015	12/2018
5	Captura, marcação e coleta de material biológico	04/2015	09/2017
6	Coleta de dados de ecologia e comportamento	10/2015	12/2018
7	Análise de todos os dados	01/2019	04/2019
8	Análise de todos os dados	01/2019	04/2019

Observações e ressalvas

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

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Thales Renato Ochotorena de Freitas	Pesquisador	738.934.600-63	7016633021 SSP-RS-RD	Brasileira
2	JULIO CESAR DE SOUZA JUNIOR	Coordenador	004.957.679-80	20280900 SSP-GC	Brasileira
3	Katiuscia Kalline Durão	Pesquisadora	069.425.369-38	3861198 SSP-GC	Brasileira
4	Amanda Rezende Peruchi	técnica do projeto bugio da FURB	079.508.426-96	12769967 ssp-MG	Brasileira
5	Cristiana Ferreira Alves de Brito	Pesquisadora	682.133.796-91	M-3.989.363 SSP-MG	Brasileira
6	ZELINDA MARIA BRAGA HIRANO	Coordenadora	048.975.078-80	138942547 SSP-SP	Brasileira
7	Leticia Panaro Lunardi	Pesquisadora	062.637.539-86	3670191 SSP-GC	Brasileira

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

Código de autenticação: 57756731



Página 1/3