

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

Estudo de base populacional na Amazônia Brasileira: avaliação da resposta de anticorpos naturalmente adquiridos contra a *Duffy binding protein* (DBP) de *Plasmodium vivax*

por

Laise Rodrigues Reis

Belo Horizonte

2018

DISSERTAÇÃO

MCS – IRR L. R. REIS

2018

Laise Rodrigues Reis

**ESTUDO DE BASE POPULACIONAL NA AMAZÔNIA BRASILEIRA: AVALIAÇÃO
DA RESPOSTA DE ANTICORPOS NATURALMENTE ADQUIRIDOS CONTRA A
Duffy binding protein (DBP) DE *Plasmodium vivax***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Doenças infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis

Orientação: Dr^a. Flora Satiko Kano
Coorientação: Dr^a. Luzia Helena Carvalho

Belo Horizonte

2018

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

R375e Reis, Laise Rodrigues.
2018

Estudo de base populacional na Amazônia Brasileira: avaliação da resposta de anticorpos naturalmente adquiridos contra a *Duffy binding protein* (DBP) de *Plasmodium vivax* / Laise Rodrigues Reis. – Belo Horizonte, 2018.

XIV, 62 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 54 - 62

Dissertação de mestrado – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis.

1. *Plasmodium vivax* 2. *Duffy binding protein* 3. Anticorpos I. Título. II. Kano, Flora Satiko (Orientação). III. Carvalho, Luzia Helena (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.936

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por todo apoio, dedicação e por
não medirem esforços para concretização dos
meus objetivos e sonhos.*

A todos que sofrem ou sofreram com a malária.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me iluminar, acalmar meu coração diante das dificuldades e por sempre me mostrar o melhor caminho a seguir. “Devemos tudo Àquele que nos deu sabedoria para descobirmos nossa vocação e força para superarmos os obstáculos, tornando um sonho realidade”. Obrigada, Senhor!

Também agradeço aos meus queridos e amados pais Lázaro e Marlene, por todo amor, apoio, dedicação e por não medirem esforços para a realização dos meus objetivos e sonhos. O meu muito obrigada é pequeno diante da grandeza que fizeram por mim. Como sou abençoada por tê-los como meus pais!

À minha orientadora, Dra. Flora Satiko Kano, por acreditar no meu potencial. Obrigada pela oportunidade, confiança, ensinamentos e auxílio em cada passo, que foram fundamentais para o meu crescimento e amadurecimento profissional.

À minha coorientadora, Dra. Luzia Helena Carvalho, também pela oportunidade, por sempre estar disponível quando necessário e por todas as sugestões sempre muito construtivas.

À Dra. Mônica Nunes pela colaboração, sem a qual seria impossível a realização desse trabalho.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Às agências de fomento (CAPES, FAPEMIG, PROEP/CNPq/FIOCRUZ, CNPq, FAPAC) 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.

A todos os membros do Laboratório de Malária, pela convivência, aprendizagem juntos e por sempre estarem disponíveis para ajudar.

À Helena, por todo companheirismo e curiosidade, que sempre me fizeram aprender ainda mais.

Aos meus amigos da pós-graduação, pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Aos meus queridos amigos científicos e de vida Aracele, Lara, Camila, Mika, Denise e Sarah por todo apoio, amizade e momentos que passamos juntos. Obrigada por todo incentivo, por estarem sempre ao meu lado e por terem tornado a caminhada mais leve!

Ao meu noivo e companheiro de todas as horas, Gabriel Costa, por todo carinho, amizade, apoio, compreensão, dedicação, paciência e amor.

Aos meus grandes amigos Lucas Penido, Vanessa e Carla, por todos esses anos de amizade, conselhos e por estarem ao meu lado em todos os momentos, sejam eles alegres ou tristes. Vocês me ensinaram o significado e o valor de uma amizade verdadeira!

À toda minha família, por todas as orações, mensagens positivas e de motivação. Vocês são a minha base!

*"Pois onde estiver o teu tesouro, aí
também estará o teu coração."*

(Mateus 6:21)

RESUMO

O processo de invasão dos eritrócitos pelo *Plasmodium vivax* envolve a interação da região II da *Duffy binding protein* (DBP_{II}) e o antígeno *Duffy* receptor para quimiocinas (DARC) expresso na superfície dos eritrócitos. Devido à importância da PvDBP em garantir o parasitismo nos eritrócitos, faz-se um importante candidato à vacina antimalárica. Sendo assim, realizamos um estudo longitudinal de base populacional para avaliar a dinâmica da infecção por malária e a persistência de anticorpos naturalmente adquiridos contra a PvDBP_{II} durante 16 meses em uma população urbana do município de Mâncio Lima, estado do Acre. No total, 1326 indivíduos foram envolvidos no estudo, onde 1100 indivíduos participaram da linha de base e, 1120 indivíduos após 16 meses, com uma contribuição de 2237 amostras. A prevalência de malária na população foi de 9,6% (127/1326), com predominância de infecção causada por *P. vivax* (74%). Em relação a resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II}, 22,5% (299/1326) foram respondedores à PvDBP_{II}. A regressão logística múltipla mostrou que as variáveis preditoras à positividade para PvDBP_{II} foram idade, episódios prévios de malária e malária recente. Após 16 meses, houve uma redução significativa da frequência de anticorpos anti-PvDBP_{II} de 24,7% (272/1100) para 15,8% (177/1120), que coincidiu com a diminuição dos casos de malária. Pelo acompanhamento de 894 indivíduos identificamos que 70,0% (626/894) foram não respondedor persistente (NRP) com resposta de anticorpos negativa em todo momento, 17,4% (156/894) respondedor transiente (RT), que teve flutuação na resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} e apenas 12,5% (112/894) foram respondedor persistente, ou seja, tinham resposta de anticorpos positiva no período de 16 meses do estudo. Pela análise de regressão logística múltipla as variáveis preditoras para a persistência de anticorpos contra a PvDBP_{II} foram as mesmas associadas com a positividade (idade, episódios prévios de malária e tempo desde a última malária). Em conclusão, o presente trabalho reforça que a PvDBP_{II} tem baixa imunogenicidade, pois apenas 20% dos indivíduos respondem a PvDBP_{II}, e confirmam estudos prévios realizados na região amazônica onde tanto a presença quanto a persistência de anticorpos contra a PvDBP_{II} estão associados com exposição (idade, número de episódios prévios de malária e malária recente).

Palavras-chave: *Plasmodium vivax*, *Duffy binding protein*, Anticorpos, ELISA, Acre.

ABSTRACT

The erythrocytes invasion process by *Plasmodium vivax* involves the interaction between region II of *Duffy binding protein* (DBP_{II}) and *Duffy* antigen receptor for chemokines (DARC) expressed on the erythrocytes surface. Due to its functional in guarantee the parasitism into erythrocytes, even in DARC negative individuals, DBP is the major *P. vivax* vaccine candidate. Here, we carried-out a population-based cohort study to evaluate the dynamics of malaria infection and persistence of DBP_{II} antibody response in the urban population of Mâncio Lima county during 16 months interval. Overall, 1,326 individuals were enrolled in this study, where 1,100 individuals were enrolled at the baseline and 1,120 individuals enrolled 16 months later with contribution of 2,237 samples. At enrollment, the frequency of malaria infection was 9.6% (127/1,326), with predominance of *P. vivax* (74%). Regarding to DBP_{II} antibody response detected by ELISA, only 22.5% (299/1,326) was positive. Malaria-exposure variables as age, number of previous malaria episodes and time of the last malaria, were predictor of presence of antibody response. After 16-month follow-up study, there were significant reduction in the frequency of anti-DBP_{II} antibodies from 24.7% (272/1,100) to 15.8% (177/1,120). Moreover, in 894 followed-up subjects during 16 months, 70% (626/894) were classified as *persistent non-responder* (PNR) – DBP_{II} antibody response was not detectable at any time of study; 17.4% (156/894) as *transient responder* (TR) – DBP_{II} antibody response floated during the follow-up study; and only 12.5% (112/894) identified as *persistent responder* (PR) – positive for DBP_{II} antibody response in all the time of follow-up study. Based on logistic regression models only variables reflect cumulative exposure of malaria as age, number of previous malaria episodes and time of the last malaria were independent associated with persistence of DBP_{II} antibody response. In conclusion, the results showed low immunogenicity of DBP_{II} in this native population and cumulative exposure variable was predictor to both presence and persistence of DBP_{II} antibody response.

Keywords: *Plasmodium vivax*, *Duffy binding protein*, antibodies, ELISA, follow-up study, Acre.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do ciclo biológico do *Plasmodium* sp.....18
- Figura 2.** Representação do processo de invasão pelo *Plasmodium* sp em eritrócitos e interação molecular do processo de invasão pelo *P. vivax*.....21
- Figura 3.** Representação esquemática dos sete domínios estruturais da *Duffy binding protein* de *P. vivax* (PvDBP), com destaque para a região II que contém o domínio de ligação da proteína com o receptor nos eritrócitos (DARC).....23
- Figura 4.** Mapa da América do Sul com estado do Acre em destaque e localização do estado do Acre e município de Mâncio Lima.....30
- Figura 5.** Delineamento experimental do estudo longitudinal em Mâncio Lima, estado do Acre.....31
- Figura 6.** Variáveis independentemente associadas com a resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} em indivíduos do estudo de base populacional em Mâncio Lima, estado do Acre.....40
- Figura 7.** Distribuição temporal dos casos de malária e resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} na população estudada de Mâncio Lima, estado do Acre, Brasil...41
- Figura 8.** Variáveis independentemente associadas com a persistência de resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II}.....45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos, epidemiológicos e imunológicos dos 1.326 indivíduos envolvidos no estudo populacional em Mâncio Lima, estado do Acre, Brasil.....	34
Tabela 2. Fatores de risco associados à infecção por malária em 1.326 indivíduos recrutados no estudo de Mâncio Lima, estado do Acre, Brasil.....	36
Tabela 3. Fatores associados com a presença de anticorpos contra a PvDBP _{II} em 1.326 indivíduos envolvidos no estudo de Mâncio Lima, estado do Acre, Brasil.....	38
Tabela 4. Dados demográficos e epidemiológicos dos grupos com perfis de resposta de anticorpos distintos contra a PvDBP _{II} em 894 indivíduos participantes do estudo longitudinal em Mâncio Lima, estado do Acre, Brasil.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMA-1	Antígeno 1 de membrana apical (<i>Apical membrane antigen 1</i>)
aOR	<i>Odds Ratio</i> ajustado para as variáveis de confusão
BIAbs	Anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC
DARC	Antígeno do grupo sanguíneo <i>Duffy</i> /receptor para quimiocinas (<i>Duffy Antigen/Chemokine Receptor</i>)
DBP	<i>Duffy binding protein</i>
DO	Densidade ótica
EBP2	<i>Erythrocyte binding protein</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FTA	papel de filtro para preservação de DNA
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IC	Intervalo de confiança
IgG	Imunoglobulina da classe G
IQR	Intervalo Interquartil
IR	Índice de Reatividade
MSP1-19	Fragmento C-terminal de 19kDa da proteína principal de superfície do merozoíto
NRP	Não respondedor persistente
OPD	Cromógeno ortofenilenodiamino diidrocloreto (<i>o-Phenylenediamine Dihydrochloride</i>)
OR	<i>Odds Ratio</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PBS-T	Salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween 20
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
PvDBP	Proteína de ligação ao antígeno do grupo sanguíneo <i>Duffy</i> /DARC (<i>Duffy binding protein</i> de <i>Plasmodium vivax</i>)
PvDBP _{II}	Região II da <i>Duffy binding protein</i> de <i>Plasmodium vivax</i>
RBP2	<i>Reticulocyte-binding protein 2b</i>
RP	Respondedor persistente à PvDBPII
RT	Respondedor transiente à PvDBPII

SIVEP-Malária	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica de
SVS/MS	Sistema de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde do Brasil
TfR1	Receptor da transferrina 1
TLCE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Aspectos gerais da malária.....	15
1.2 Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> sp.....	17
1.3 Processo de invasão dos eritrócitos pelo <i>Plasmodium vivax</i>	19
1.4 <i>Duffy binding protein</i> de <i>Plasmodium vivax</i>	22
1.5 Resposta imune contra a <i>Duffy binding protein</i> de <i>Plasmodium vivax</i>	23
2 JUSTIFICATIVA.....	26
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivos específicos.....	28
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 Área e população de estudo.....	29
4.2 Desenho experimental do estudo longitudinal.....	30
4.3 Diagnóstico de malária.....	31
4.4 Proteína recombinante e detecção de anticorpos contra a PvDBP _{II} pela sorologia convencional.....	32
4.5 Análise dos dados.....	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Características da população de estudo.....	34
5.2 Prevalência de malária e riscos associados à infecção.....	35
5.3 Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra a PvDBP _{II}	36
5.4 Dinâmica da infecção malárica e resposta de anticorpos contra a PvDBP _{II} no estudo longitudinal de 16 meses.....	40
5.5 Características, incidência de malária e persistência de anticorpos contra a PvDBP _{II} em indivíduos acompanhados durante 16 meses.....	42
6 DISCUSSÃO.....	46
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da malária

A malária é uma doença infecto-parasitária de grande importância mundial que ocorre em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo. A doença é causada por protozoários do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Existem cinco espécies principais causadoras de malária no homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, que naturalmente infecta primatas não humanos (COX SINGH et al., 2008; MENARD et al., 2010; ONG'ECHA et al., 2006) e *P. simium* (BRASIL et al., 2017). As espécies que ocorrem de forma autóctone no Brasil são *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, sendo a espécie *P. vivax* responsável por cerca de 85% dos casos (SAÚDE, 2015; WHO, 2017).

Em 2016, foram registrados 216 milhões de casos de malária em 91 países com 445.000 mortes (WHO, 2017). No Brasil, apesar da tendência de diminuição do número de casos observados nos últimos anos, em 2017 observou-se um aumento significativo no número de casos registrados, o que reforça que a doença continua sendo um problema de saúde pública, com 190 mil casos notificados no ano de 2017 (SVS/MS, 2017). Desse total, 99,9% dos casos ocorrem na Região da Amazônia Legal, área endêmica de malária, que é composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Nessa área, a transmissão de malária é heterogênea, com distribuição espacial da doença em escala individual, comunitária, municipal e estadual (CASTRO et al., 2006). A transmissão é instável, onde a população exposta é composta principalmente por imigrantes de áreas não endêmicas (CAMARGO et al., 1994a).

Com a introdução dos projetos de colonização voltados para a agricultura, extração mineral e assentamento ocorridos na década de 90, observou-se um extenso crescimento populacional na região Amazônica devido ao processo de imigração (CASTRO et al., 2006; CRUZ MARQUES, 1987). Assim, observou-se populações sendo assentadas seguido por uma mudança no perfil de transmissão da malária com um aumento no número de casos no Brasil, dos quais cerca de 99,7% estavam concentrados na Amazônia Legal (CASTRO et al., 2006). A partir do

ano 2000, houve uma mudança do perfil da população, no qual observou-se populações nativas da Amazônia, reflexo do incentivo ao desenvolvimento da região (CASTRO et al., 2006).

As campanhas de erradicação e controle de malária na Amazônia, iniciadas na década de 50, conseguiram reduzir cerca de 60% de todos os casos relatados no país (DEANE, 1988). Em 2015, houve uma redução de 89% do número de casos registrados nos últimos 15 anos (PENIDO, 2016). A redução observada se deve principalmente ao Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), promovido pelo Ministério da Saúde do Brasil, o qual possui como objetivos a redução da mortalidade e incidência da doença, eliminação da transmissão em áreas urbanas e manutenção da ausência da transmissão em locais onde a doença foi interrompida. Para isso, o programa visa o diagnóstico e tratamento precoce, bem como o fortalecimento da vigilância em malária e capacitação de recursos humanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Essas medidas de controle associadas ao maior investimento de recursos, têm contribuído para uma redução do número de casos de malária no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

No entanto, no último ano de 2017 foi observado um aumento expressivo de casos registrados no país, com aumento de cerca de 47% comparado ao ano anterior (SVS/MS, 2017). No estado do Amazonas, o aumento foi de 63% quando comparado ao ano de 2016, com cerca de 80.323 casos registrados no ano (SVS/MS, 2017). Do total do número de casos registrados no Brasil, cerca de 45% são provenientes de municípios dos estados do Acre e Amazonas (WHO, 2017).

Tendo em vista os recentes dados, observa-se que a transmissão da malária na Amazônia Brasileira continua sendo um grande desafio. Alguns fatores têm prejudicado o controle da doença, como a urbanização descontrolada e fatores ambientais, que podem contribuir para a proliferação dos mosquitos vetores e, conseqüentemente, aumentar a transmissão de malária na região (LAPOUBLE et al., 2015). Além disso, o aumento de parasitos resistentes às drogas antimaláricas, infecções assintomáticas, bem como investimento econômico no controle da doença, também são fatores que dificultam o controle e eliminação da doença no

Brasil, assim como em regiões no mundo onde a malária ocorre (FERREIRA; CASTRO, 2016; LAPOUBLE et al., 2015).

Além dos fatores descritos acima, o *P. vivax* possui algumas características particulares que torna sua eliminação ainda mais desafiadora, tais como: (i) o aparecimento precoce de estágios sexuais (gametócitos) na circulação sanguínea, que torna possível a transmissão aos vetores antes do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos (WHITE, 2017); (ii) baixas parasitemias e infecções assintomáticas, que podem atuar como reservatórios do parasito, o que favorece a manutenção da transmissão da doença (IMWONG et al., 2016); (iii) formação de hipnozoítos, que são formas latentes que permanecem albergados no fígado por tempos variáveis (meses e até anos) e podem causar recaídas da doença (MUELLER et al., 2009).

Vale ressaltar que embora a maior parte dos casos de malária ocorram na região Amazônica, casos da doença também podem ocorrer na região extra-Amazônica, ou seja, fora da área endêmica de malária. Esses casos podem ocorrer devido a importação de casos de outros países e estados brasileiros endêmicos para malária. A transmissão da doença é facilitada pela presença do mosquito vetor, uma vez que ele se encontra em todo o território nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; SAÚDE, 2015). Em regiões de Mata Atlântica, casos autóctones de malária têm sido registrados. Assim, indivíduos que vivem próximos ou em contato com essas áreas são susceptíveis à infecção. As espécies mais identificadas como causadoras da doença nessas áreas são *P. vivax* e *P. malariae*. Recentemente, trabalhos demonstraram que espécies de plasmódios que acometem símios, também podem estar envolvidas em casos humanos notificados em áreas extra-amazônicas (BRASIL et al., 2017; DE PINA-COSTA et al., 2014; FERREIRA; CASTRO, 2016).

1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium* sp

O ciclo biológico do *Plasmodium* sp é complexo e tem sido alvo de vários estudos. Em geral, o ciclo é dividido em duas fases: (i) fase assexuada, que ocorre no hospedeiro vertebrado e, (ii) fase sexuada, que ocorre em fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* (Figura 1). A fase assexuada inicia-se quando as fêmeas de

anofelinos realizam o repasto sanguíneo e as formas infectantes, denominadas esporozoítos, são inoculadas na pele do hospedeiro (AMINO et al., 2006; DOOLAN et al., 2009; PRUDÊNCIO et al., 2006; YAMAUCHI et al., 2007). Estima-se que 50% dos esporozoítos podem permanecer na pele do hospedeiro (MÉNARD et al., 2013) e 10% podem sobreviver durante semanas e se desenvolverem na derme, epiderme e folículos pilosos (GUEIRARD et al., 2010). Além disso, apenas metade dos esporozoítos inoculados na pele alcançará o fígado (HOLZ et al., 2016).

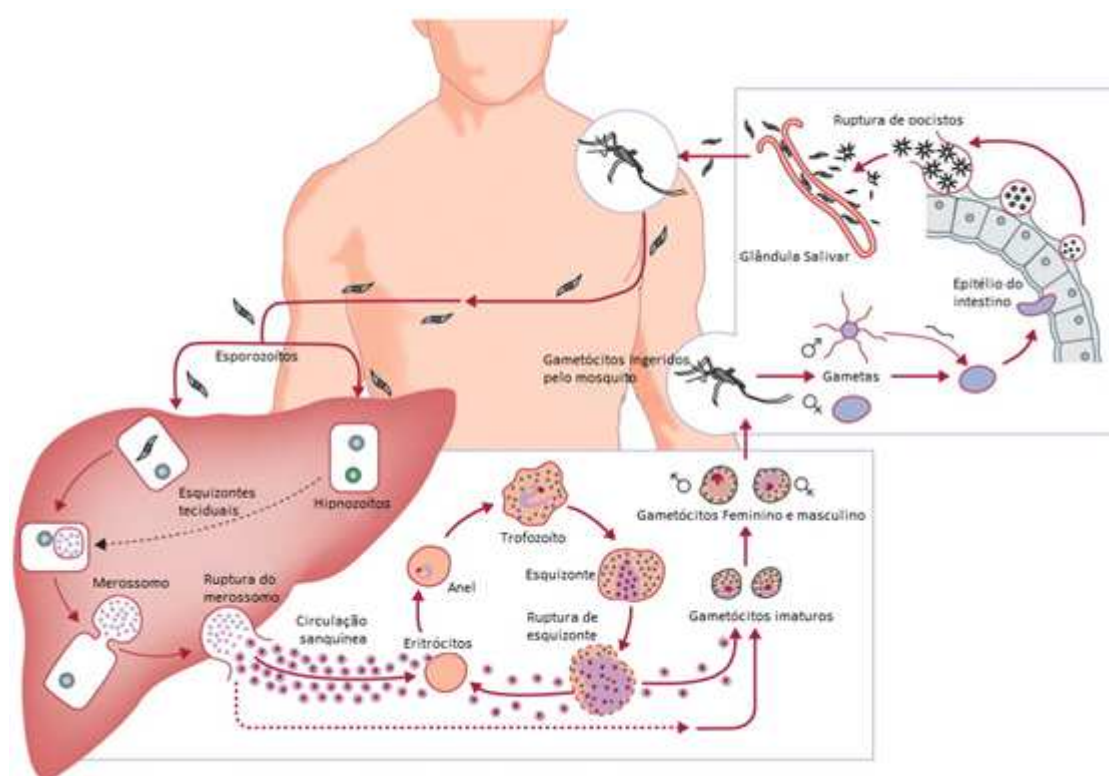


Figura 1: Representação esquemática do ciclo biológico do *Plasmodium* sp. Adaptado de Mueller et al., 2009.

No fígado, os esporozoítos migram através de várias células antes de se desenvolverem no interior do hepatócito. Há então a formação do vacúolo parasitóforo com a diferenciação de esporozoítos em trofozoítos e, após várias divisões por esquizogonia, ocorre a formação dos esquizontes (HOLZ et al., 2016; MOTA, 2001). Em infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitos podem permanecer em estado de latência no fígado (hipnozoítos) por meses ou até anos após a infecção inicial, sendo responsáveis pelos casos de recaídas (KROTOSKI, 1985). Os esquizontes maduros liberam os merozoítos diretamente na corrente

sanguínea por meio de brotamento de vesículas denominadas merossomos (STURM et al., 2006).

Uma vez liberados na corrente sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos e inicia-se a fase eritrocítica do ciclo, o qual é responsável pela sintomatologia clínica da doença. O processo de invasão do merozoíto nos eritrócitos ocorre por meio de interações específicas entre receptores expressos na superfície dos eritrócitos e proteínas do parasito (COWMAN; CRABB, 2006; PETTER; DUFFY, 2015). Após diversas gerações de merozoítos, alguns se diferenciam em formas sexuais do parasito, dando origem aos macrogametócitos (feminino) e os microgametócitos (masculinos). Os gametócitos, quando são ingeridos pelo mosquito vetor (anofelino) durante o repasto sanguíneo, dão início à fase sexuada do ciclo.

No sistema digestivo (intestino médio) da fêmea do anofelino, ocorre a diferenciação e fecundação dos gametócitos masculinos e femininos, dando origem ao zigoto (VLACHOU et al., 2006). Posteriormente, há o desenvolvimento em oocinetos móveis, que atingem a camada de células epiteliais do intestino médio e passa a se chamar oocisto (BARILLAS-MURY; KUMAR, 2005). Os oocistos amadurecem dando origem aos esporozoítos, que migram para a glândula salivar, amadurecem e tornam-se infectantes. Neste momento, podem ser transmitidos para o hospedeiro vertebrado, completando-se o ciclo biológico dos plasmódios (CROMPTON et al., 2014; MEIBALAN; MARTI, 2016).

1.3 Processo de invasão dos eritrócitos pelo *Plasmodium vivax*

O processo de invasão dos eritrócitos pelo *Plasmodium* sp é complexo e envolve várias etapas compostas por interações específicas do tipo ligante-receptor. De forma resumida, este processo é dividido em quatro fases: (1) ligação de baixa afinidade e reversível entre o merozoíto e a membrana do eritrócito; (2) reorientação do parasito de forma que o complexo apical entre em contato com a membrana eritrocítica e posteriormente ocorra uma junção irreversível; (3) deslocamento da junção para o pólo posterior do parasito seguida da liberação do conteúdo das organelas apicais, principalmente das roptrias e micronemas; (4) invasão do parasito nos eritrócitos e formação do vacúolo parasitóforo, o qual o merozoíto irá se

desenvolver (Figura 2A) (BEESON; CRABB, 2007; COWMAN; CRABB, 2006; OH; CHISHTI, 2005).

Embora o mecanismo geral de invasão pelos plasmódios na célula hospedeira seja semelhante, há características distintas entre as duas espécies de maior importância do ponto de vista em saúde pública, *P. falciparum* e *P. vivax*. Enquanto que, na fase de junção irreversível, são conhecidas diversas vias de invasão no eritrócito pelo *P. falciparum* (PETTER; DUFFY, 2015), até o momento para *P. vivax* é conhecido apenas uma única via de invasão no reticulócito (ADAMS et al., 1992).

Assim, diferentemente do *P. falciparum*, o *P. vivax* invade preferencialmente, se não exclusivamente, os reticulócitos (eritrócitos imaturos) e, até o momento, a única via de invasão conhecida do *P. vivax* envolve a interação entre a proteína *Duffy binding protein* (DBP) do micronema de *P. vivax* e o receptor para quimiocinas do grupo sanguíneo *Duffy* (DARC, do inglês *Duffy Antigen/Chemokine Receptor*), expresso na superfície dos eritrócitos (ADAMS et al., 1990; GRIMBERG et al., 2007). Quando a PvDBP é liberada das organelas apicais do merozoito, encontra-se na forma de monômeros. No entanto, no momento da ligação irreversível ao receptor DARC, o sítio de ligação na região II da PvDBP é formado após a dimerização da proteína, que é essencial para a posterior dimerização do receptor DARC. Dessa forma, o complexo final da interação é composto por duas moléculas da PvDBP e duas moléculas do receptor DARC (Figura 2B) (BATCHELOR et al., 2012). Uma vez estabelecida a ligação entre a PvDBP e o receptor DARC, o processo de invasão torna-se irreversível (WERTHEIMER; BARNWELL, 1989). Dessa forma, indivíduos que não expressam o receptor na superfície dos eritrócitos (DARC negativo) são altamente resistentes à infecção por *P. vivax* (MILLER et al., 1976). No entanto, alguns estudos mostraram indivíduos DARC negativos residentes da ilha de Madagascar, da África (Quênia) e do Brasil, infectados com *P. vivax*, o que sugere uma via alternativa para invasão (CAVASINI et al., 2006, 2007; NIANGALY et al., 2017; RYAN et al., 2006). Um estudo recente que analisou indivíduos DARC negativos infectados por *P. vivax* da Etiópia, observou até oito cópias do gene da PvDBP, que sugere não só uma via alternativa de invasão, mas também uma adaptação do parasito (GUNALAN et al., 2016).

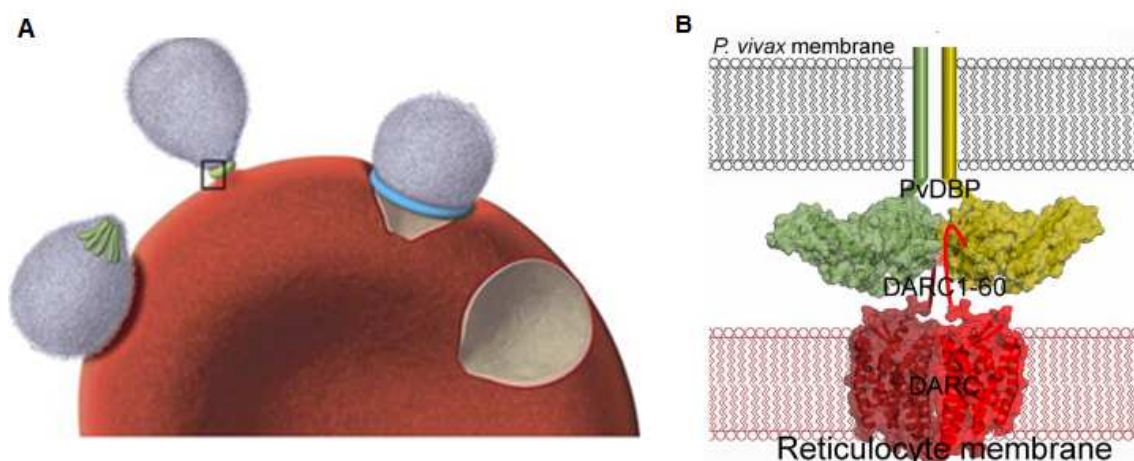


Figura 2: Representação do processo de invasão pelo *Plasmodium* sp em eritrócitos e interação molecular do processo de invasão pelo *P. vivax*. **(A)** Esquema do processo de invasão do *Plasmodium* sp no eritrócito, envolvendo etapas como adesão, orientação da extremidade apical do merozoíto, formação de junção e invasão; **(B)** Representação da interação molecular entre o receptor DARC, expresso na membrana do reticulócito e a *Duffy binding protein* de *P. vivax* (PvDBP). Adaptado de Beeson e Crabb, 2007 e Batchelor et al., 2012.

Vários estudos têm apontado diferentes proteínas envolvidas no processo de invasão dos reticulócitos como potenciais candidatas à vacina e marcadores de infecção recente de *P. vivax*. Uma delas é o fragmento C-terminal de 19kDa da proteína principal de superfície do merozoíto (MSP1-19), que se mostrou capaz de induzir anticorpos de vida longa (WIPASA et al., 2010). Outra proteína promissora como candidato à vacina é o antígeno apical de membrana -1 (AMA-1), que também se mostrou naturalmente imunogênica em indivíduos expostos à malária (RODRIGUES et al., 2005). Mais recentemente, foi identificada a proteína *Erythrocyte binding protein* (EBP2), que se liga preferencialmente a reticulócitos jovens DARC positivos (NTUMNGIA et al., 2016) e também se mostrou altamente imunogênica em indivíduos expostos à malária em estudos realizados por nosso grupo (dados não publicados).

Outra proteína que se liga ao reticulócito é a *Reticulocyte-binding protein 2b* (RBP2), cujo o receptor cognato no reticulócito - o receptor da transferrina 1 (TfR1) - foi recentemente identificado. No processo de invasão, a interação entre a RBP2b e TfR1 é estável e, devido ao fato de que células deficientes do receptor TfR1 se mostraram refratárias à infecções por *P. vivax*, faz desta proteína uma proteína promissora como candidato à vacina (GRUSZCZYK et al., 2018).

Entretanto, devido a importância da PvDBP em garantir o parasitismo na célula hospedeira e as evidências científicas demonstrarem que indivíduos DARC negativos são resistentes à infecção pelo *P. vivax*, bem como o fato desta proteína ser naturalmente imunogênica em indivíduos expostos à malária (CERÁVOLO et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005; SOUZA-SILVA et al., 2010) e anticorpos bloqueadores da interação DBPII-DARC estarem associados com proteção clínica (NICOLETE et al., 2016), este antígeno tem sido apontado como um importante candidato para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária causada pelo *P. vivax*.

1.4 Duffy binding protein de *Plasmodium vivax*

A *Duffy binding protein* de *P. vivax* (PvDBP) é uma proteína de micronema de 140 kDa pertencente à família de proteínas de adesão, expressa durante o ciclo eritrocítico do plasmódio (ADAMS et al., 1990). A PvDBP é exposta somente no momento da invasão, com a exposição do complexo apical. Nesse momento, a proteína se liga rapidamente ao receptor de quimiocinas DARC, expresso na superfície dos eritrócitos (WERTHEIMER; BARNWELL, 1989).

A PvDBP é dividida em sete regiões: uma região que contém o peptídeo sinal (região I), duas regiões ricas em cisteínas amino e carboxi-terminal (região II e VI, respectivamente), três regiões hidrofílicas (região III, IV e V), um domínio transmembrana e um curto segmento citoplasmático (região VII) (ADAMS et al., 1990; FANG et al., 1991). A região II contém o ligante funcional da PvDBP, que possui cerca de 300 aminoácidos (aminoácido 206 ao 530), onde está localizado o domínio de ligação ao eritrócito. Este domínio contém 170 aminoácidos e encontra-se entre as cisteínas 4 e 7 (Figura 3) (RANJAN; CHITNIS, 1999; SINGH et al., 2003).

Estudos demonstraram que a região II é a região mais polimórfica da proteína e que difere entre os isolados do parasito provenientes de diferentes regiões geográficas (GOSI et al., 2008; KHO et al., 2001; SOUSA et al., 2006; SUH et al., 2001). Nosso grupo também demonstrou alta variabilidade da PvDBP_{II} entre os isolados de *P. vivax* de diferentes regiões da Amazônia brasileira. Além disso, alguns destes polimorfismos na região II da PvDBP estão próximos ao domínio de

ligação da proteína ao reticulócito, o que sugere que estes polimorfismos tenham função no mecanismo de evasão do sistema imune (SOUSA et al., 2010).

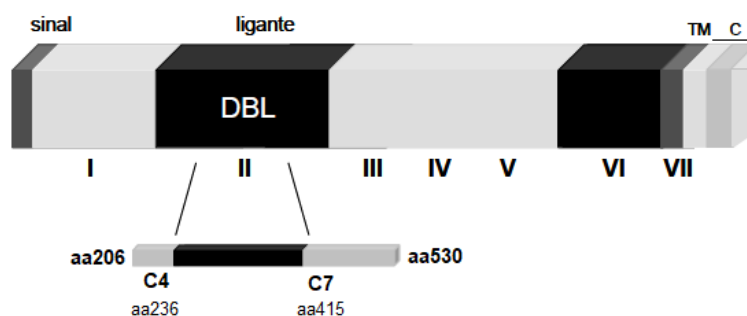


Figura 3: Representação esquemática dos sete domínios estruturais da *Duffy binding protein* de *P. vivax* (PvDBP), com destaque para a região II que contém o domínio de ligação da proteína com o receptor nos eritrócitos (DARC). Adaptado de Vanbuskirk et al., 2004.

1.5 Resposta imune humoral contra a *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax*

Para o desenvolvimento de uma vacina eficaz para malária causada por *P. vivax*, é necessário compreender a resposta imune de indivíduos naturalmente expostos ao parasito (LONGLEY et al., 2017; MAESTRE et al., 2010). Para isso, a sorologia convencional (ELISA) tem sido bastante utilizada na avaliação dos níveis de anticorpos IgG em diferentes populações. Os estudos mostram que a imunidade naturalmente adquirida contra a malária se desenvolve de forma lenta e gradativa após repetidas infecções e, com isso os indivíduos passam a adquirir uma proteção clínica contra a doença, tornando-se pouco sintomático ou inclusive, assintomático (LANGHORNE et al., 2008; MARSH; KINYANJUI, 2006; MARTINS et al., 2015). Entretanto, na ausência de exposição contínua ao parasito, há uma redução ou perda dessa imunidade (CROMPTON et al., 2010; GHANI et al., 2009; LANGHORNE et al., 2008). Dessa forma, a exposição contínua ao parasito parece ser fundamental tanto para a aquisição quanto para a persistência de anticorpos (NJAU; JACOB, 2012).

Alguns estudos para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a malária têm sido realizados com base na proteção clínica. No caso de uma vacina contra o *P. vivax*, diversos antígenos têm sido avaliados, sendo a PvDBP uma das mais promissoras. Como já foi descrito, a PvDBP é exposta somente no momento da invasão, que ocorre por segundos, e rapidamente se liga ao receptor DARC, sendo,

portanto, pouco exposta ao sistema imune do hospedeiro (ADAMS et al., 1990). Dessa forma, a PvDBP é uma proteína pouco imunogênica. Apesar disso, trata-se de uma proteína muito importante, pois essa é a única via de invasão conhecida que o *P. vivax* utiliza para infectar os eritrócitos (ADAMS et al., 1992; MILLER et al., 1976).

Em regiões hiperendêmicas de malária, como na Papua Nova Guiné, estudos observaram que 60 a 80% dos indivíduos desenvolvem resposta de anticorpos contra a PvDBP, e essa variação está associada com o tempo de exposição à malária (FRASER et al., 1997; KING et al., 2008; TRAN et al., 2005). No Brasil, nosso grupo de pesquisa demonstrou, em populações da Amazônia, que há um aumento de respondedores para a PvDBP com o aumento da idade e após repetidas infecções por *P. vivax* (CERÁVOLO et al., 2005; KANO et al., 2012; SOUZA-SILVA et al., 2010). Além disso, foi demonstrado que parte dos anticorpos contra a PvDBP detectados pela sorologia convencional, são capazes de bloquear a interação DBPII-DARC (BIAbs) (CERAVOLO et al., 2008, 2009; GRIMBERG et al., 2007; SOUZA-SILVA et al., 2014). Tal fato é importante pois os BIAbs contra a PvDBP impedem a invasão dos merozoítos nos reticulócitos, e a presença destes BIAbs com alta capacidade de inibição já foram associados com proteção clínica em crianças da Papua Nova Guiné (KING et al., 2008) e em populações de áreas rurais da Amazônia brasileira (NICOLETE et al., 2016).

Por outro lado, uma parte significativa da população da Amazônia e de outras áreas do mundo com diferentes níveis de transmissão de *P. vivax*, não são capazes de desenvolver anticorpos anti-PvDBP (FRASER et al., 1997; MICHON et al., 1998; SOUZA-SILVA et al., 2010). Os motivos que contribuem para a ausência de resposta à PvDBP ainda não são bem esclarecidos. No entanto, o fato da proteína ser exposta somente no momento da invasão dos reticulócitos pode explicar a baixa imunogenicidade. Outro fator se deve a grande variabilidade genética da PvDBP, onde os polimorfismos presentes na região II parecem influenciar na resposta imune contra esta proteína (MCHENRY; ADAMS, 2006; SOUSA et al., 2010). Além disso, estudos do nosso grupo mostraram que polimorfismos genéticos no receptor DARC e em HLA de classe II – no hospedeiro vertebrado -- também podem influenciar o

desenvolvimento e a persistência de anticorpos contra a PvDBP (SOUZA-SILVA et al., 2014;KANO et al., 2016).

Nosso grupo também demonstrou que a resposta de anticorpos bloqueadores contra a PvDBP é variante-específica e a variabilidade da PvDBP é alta nos isolados circulantes da área endêmica (CERAVOLO et al., 2009; SOUSA et al., 2011). Apesar dos questionamentos sobre o potencial da PvDBP como candidata à vacina, estudos mostraram que alguns indivíduos com histórico de longa exposição à malária na Amazônia brasileira são capazes de produzir anticorpos com alta porcentagem de inibição com ampla reatividade aos diferentes isolados (CERAVOLO et al., 2008). Além disso, também foi demonstrado que esses anticorpos possuem associação com proteção clínica para diferentes variantes da PvDBP (KING et al., 2008). Resultados similares também foram demonstrados em uma população rural no estado do Acre (NICOLETE et al., 2016). Portanto, esses resultados reforçam a PvDBP_{II} como antígeno vacinal.

Esses estudos mostram que a resposta imune contra PvDBP é complexa e difere entre as regiões geográficas de acordo com a intensidade de transmissão de malária e a população de estudo. Nesse sentido, os estudos imunoepidemiológicos em diferentes populações têm contribuído no entendimento do desenvolvimento da imunidade naturalmente adquirida aos diferentes antígenos de *P. vivax* candidatos à vacina, bem como a aquisição de proteção à malária sintomática.

2 JUSTIFICATIVA

A malária causada por *P. vivax* é um grande problema de saúde pública no Brasil, sendo a espécie responsável por 85% dos casos no país (SAÚDE, 2015; WHO, 2017). A maior parte dos casos de malária ocorrem na região da Amazônia Legal, onde as condições favoráveis de transmissão da doença e o difícil acesso ao diagnóstico e tratamento precoce, estabelecem grandes barreiras para o controle de malária no país. Nesse sentido, estudos que visam compreender a dinâmica da infecção, bem como a resposta imune naturalmente adquirida contra antígenos do parasito, são essenciais para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária, ferramenta fundamental para controle, prevenção e redução da morbidade da doença.

Os estudos imunoepidemiológicos têm contribuído no entendimento da imunidade naturalmente adquirida aos diferentes antígenos candidatos à vacina e a aquisição da proteção à malária sintomática (ADDAI-MENSAH et al., 2016; GAMAGE-MENDIS et al., 1990; WERNSDORFER, 1981). De fato, a distribuição espacial e temporal da malária no Brasil é heterogênea, com diferentes padrões de transmissão – individual, comunitária, municipal e estadual (CASTRO et al., 2006). Desta forma, essa variação pode influenciar tanto na aquisição quanto na manutenção da resposta de anticorpos contra os antígenos de plasmódios. Além disso, a população brasileira é miscigenada e o *background* genético pode diferir entre as populações, o que contribui tanto na susceptibilidade à malária quanto na proteção clínica (CASSIANO et al., 2015; LINS et al., 2010; MANTA et al., 2013). De fato, polimorfismos genéticos do receptor DARC influenciam tanto na susceptibilidade ao *P. vivax* quanto na aquisição da resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} e anticorpos bloqueadores da interação DARC-DBP (KING et al., 2008; SOUZA-SILVA et al., 2014). Além disso, nosso grupo demonstrou que a variabilidade da PvDBP_{II} é alta em isolados de *P. vivax* que circulam na região Amazônica (SOUSA et al., 2010), o que pode influenciar na resposta de anticorpos, uma vez que a resposta é variante-específica (CERAVOLO et al., 2009).

Devido ao fato da PvDBP ser fundamental para garantir o parasitismo na célula hospedeira, este antígeno é um dos mais promissores candidatos vacinais de fase sanguínea de *P. vivax*. Entretanto, os estudos mostram que há uma variação da

frequência de respondedores de 19 a 60%, dependendo da população e da área estudada (KANO et al., 2012; NICOLETE et al., 2016; SOUZA-SILVA et al., 2010), o que ressalta a importância dos estudos epidemiológicos em diferentes regiões. No que se refere aos estudos em imunoepidemiologia em diferentes populações, a maioria dos estudos disponíveis são do tipo transversais e, os estudos longitudinais, são escassos. Porém, são os estudos longitudinais que nos permitem avaliar a incidência da malária e seus fatores determinantes e/ou associados, bem como avaliar a dinâmica da resposta de anticorpos contra os antígenos do parasito.

Assim, este trabalho visa avaliar a dinâmica da infecção por malária, bem como da resposta de anticorpos contra a PvDBP e os fatores (demográficos e epidemiológicos) que contribuem na susceptibilidade à infecção, aquisição e persistência da resposta imune humoral contra esta proteína em uma população nativa da Amazônia brasileira.

3 OBJETIVOS

Avaliar a dinâmica da infecção por malária, bem como da resposta imune humoral contra a *Duffy binding protein* de *Plasmodium vivax* (PvDBP) em uma população nativa da Amazônia brasileira (estado do Acre).

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a frequência da infecção por malária em uma população nativa da Amazônia brasileira, no município de Mâncio Lima;
- Determinar a resposta de anticorpos contra a região II da PvDBP na população de Mâncio Lima, estado do Acre;
- Analisar quais os fatores de riscos associados com a infecção por malária, bem como com a resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} na população nativa de estudo de Mâncio Lima - AC;
- Avaliar a dinâmica da infecção por malária e a persistência da resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} na população do estado do Acre no período de 16 meses de estudo;
- Analisar quais fatores demográficos e epidemiológicos estão associados à aquisição e persistência da resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II}.

4 METODOLOGIA

4.1 Área e população de estudo

A área de estudo está localizada no município de Mâncio Lima (07° 36'51"S, 72° 53'45"W), no extremo oeste da região Amazônica no estado do Acre. Possui uma área de 5.453 km² e faz fronteira com Peru a oeste, Bolívia a leste, estado do Amazonas ao norte e está ligado diretamente ao município de Cruzeiro do Sul, que possui o maior número de casos de malária no estado do Acre (Figura 4). Mâncio Lima possui 15.206 habitantes, onde residem em áreas urbanas (57,3%), rurais ou ribeirinhas (37,9%) e indígenas (4,8%) (IBGE, 2010).

A temperatura média anual é de 26°C (20 a 32°C) com clima úmido e média de precipitação anual de 2.175 mm (1.600 – 2.750 mm). A estação chuvosa se estende de novembro a abril e a estação seca entre junho e outubro. As principais fontes de renda da população são a pecuária, pesca e a produção de banana e mandioca (ACRE, 2010; IBGE, 2010).

Em 2017 foram notificados 36.540 casos de malária no estado do Acre, onde a maior parte dos casos ocorreram nos municípios de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima, seguido de Rodrigues Alves. Nos últimos cinco anos, Mâncio Lima apresentou uma média anual de 5,8 mil casos de malária. No último ano, foram notificados 9.108 casos no município, onde o *P. vivax* foi a espécie mais prevalente (SVS/MS, 2017).



Figura 4: Mapa da América do Sul com estado do Acre em destaque (cinza), que faz fronteira com os países Peru e Bolívia. Localização do estado do Acre e município de Mâncio Lima, há aproximadamente 38 km de Cruzeiro do Sul.

4.2 Desenho experimental do estudo longitudinal

O estudo longitudinal, do tipo corte aberto, incluiu dois cortes transversais com intervalo de 16 meses (Figura 5). Os procedimentos padrões de cada estudo transversal incluíram: (i) entrevista de voluntários com aplicação de um questionário estruturado para obtenção de dados demográficos, epidemiológicos e sociais; (ii) coleta de sangue total de todos os voluntários em tubos vacutainer (10mL) contendo EDTA como anticoagulante e também em papel de filtro FTA (Whatman, Clifton, New Jersey, EUA) para serem utilizados na sorologia e diagnóstico molecular de malária.

A linha de base foi iniciada em fevereiro de 2012 com a participação de 1.100 indivíduos. Dezesesseis meses após a linha de base (junho de 2013), realizou-se outro corte transversal que incluiu 1.120 indivíduos. No total, 1.326 indivíduos foram incluídos no estudo com uma contribuição de 2.234 amostras. Do total, 894 (67,4%) indivíduos tiveram amostras pareadas, ou seja, participaram na linha de base e segundo corte transversal do estudo longitudinal (Figura 5).

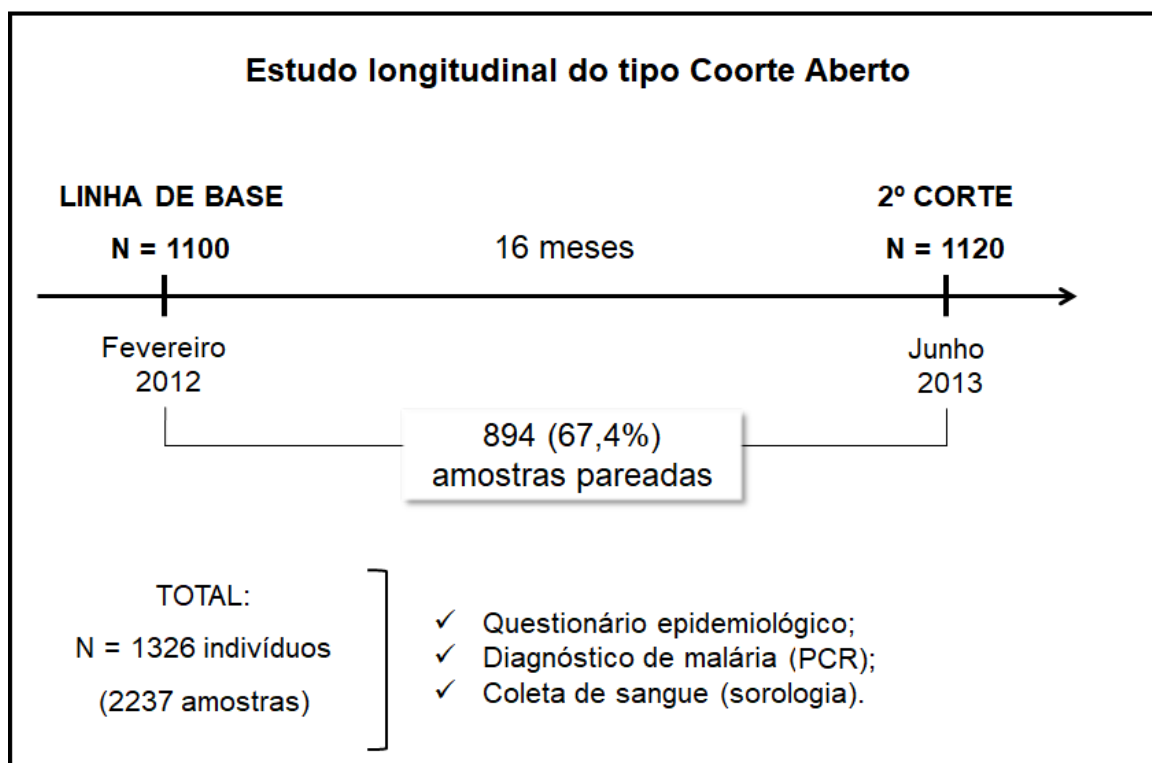


Figura 5: Delineamento experimental do estudo longitudinal em Mâncio Lima, estado do Acre.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Acre (protocolo 23107.016975/2011-28). Todos os voluntários foram esclarecidos sobre o estudo, seguido de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TLCE), termo de assentimento no caso de adolescentes (14 a 17 anos de idade) ou autorização do responsável no caso de crianças.

4.3 Diagnóstico de malária

O diagnóstico de malária foi realizado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real a partir da amplificação espécie-específica do rRNA 18S de parasitos de malária humana, conforme descrito por Kimura e colaboradores (1997) com algumas modificações (WIN et al., 2002). Os casos de malária notificados no período de fevereiro de 2012 a julho de 2013 foram obtidos no Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária (SIVEP-Malária) de cada voluntário.

4.4 Proteína recombinante e detecção de anticorpos contra a PvDBP_{II} pelo método de ELISA

Para avaliação da resposta de anticorpos antígeno-específico de *P. vivax* foi utilizada a proteína recombinante *Duffy binding protein*, variante Salvador-1, contendo a região II (DBP_{II}, aminoácido 243 ao 573). A PvDBP_{II} recombinante foi expressa em *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS transformada com o plasmídeo recombinante (pET21a/dbpII) em fusão com uma cauda de poli-histidina (6xHis), cuja massa molecular é de 39 kDa. A PvDBP_{II} foi purificada em coluna de níquel, submetida ao processo de redobrimento (*refolding*), dialisada e quantificada pelo método de Bradford (Bio-Rad). O protocolo de produção da PvDBP_{II} foi realizado conforme descrito por Ntumngia e colaboradores (2012).

A detecção de anticorpos IgG totais anti-PvDBP_{II} foi realizada pelo ensaio de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) segundo protocolo padrão. A concentração da PvDBP_{II}, diluição dos plasmas e anticorpos secundários (conjugado e anti-IgG humano) foram determinados previamente por titulação (SOUZA-SILVA et al., 2014). Sendo assim, placas de 96 poços (Thermo Scientific Nunc) foram sensibilizadas com 3 µg/mL de PvDBP_{II} recombinante diluída em PBS 1x por 18h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS-T (PBS 1x contendo 0,05% de Tween 20), adicionado o tampão de bloqueio (PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado) e incubado por 1h a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS-T, os soros testes diluídos em 1:100 foram adicionados em duplicatas e incubados por 1h a 37°C. Após a lavagem com PBS-T, foi adicionado o conjugado anti-IgG humano ligado à peroxidase diluído em 1:5.000 (PBS-T contendo 3% de leite em pó desnatado). Após a incubação (37°C por 1h) e lavagem em PBS-T, as placas foram reveladas com adição da solução contendo 4 mg OPD (*o-Phenylenediamine Dihydrochloride*) (Sigma-Aldrich) diluído em 0,1M tampão citrato de sódio (pH 5,0) contendo 40µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 30% (Sigma-Aldrich). Após 20 minutos, a reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico 4N. A densidade ótica foi medida em filtro de 492_{nm} (DO492_{nm}) em um leitor automático de ELISA (Spectra Max M5, Molecular Devices). O ponto de corte ou limite de detecção (*cut off*) foi definido utilizando a média da DO492_{nm} de 30 soros de indivíduos nunca expostos à malária acrescido de três vezes o desvio padrão. O

valor do *cut off* foi de 0,100. Os resultados foram expressos em índice de reatividade (IR), que foi calculado pela média da DO492_{nm} da amostra dividido pelo *cut off*. As amostras com IR maior que 1 ($IR > 1$) foram consideradas positivas.

4.5 Análise dos dados

Inicialmente, um banco de dados foi construído no software SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA) com as informações epidemiológicas, demográficas e sociais obtidas a partir do questionário aplicado aos voluntários. As análises estatísticas foram realizadas no programa Prism 6.0 (GraphPad software) e/ou Stata. As diferenças de proporções entre os grupos foram analisadas pelo teste exato de Fisher e/ou qui-quadrado (χ^2), quando apropriado. A avaliação da normalidade das variáveis contínuas foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk. A correlação de Spearman ou Pearson foi realizada para avaliar a correlação entre as variáveis. A diferença entre a média/mediana entre os grupos foi analisada pelo teste Kruskal-Wallis ou ANOVA, seguido pelo teste post-hoc de Dunn's ou Tukey, quando apropriado. O nível de significância estatística considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

O modelo de regressão logística múltipla (método *stepwise forward*) foi construído para analisar a associação independente entre as variáveis demográficas, epidemiológicas e sociais e morbidade de malária ou resposta de anticorpos IgG anti-PvDBP_{II}. As variáveis que mostraram nível de significância de 10% foram selecionadas para inclusão no modelo. As variáveis incluídas no modelo de regressão logística foram: idade, sexo, tempo de residência em Mâncio Lima, tempo de residência na região amazônica, episódios prévios de malária e ocupação. A regressão logística foi realizada no programa Stata v.10 e apenas as variáveis com nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$) foram mantidas no modelo final. O Teste exato Mid-P, com 95% de intervalo de confiança, foi utilizado para estimar a incidência de malária (número de casos/pessoas/meses).

5 RESULTADOS

5.1 Características da população de estudo

O estudo longitudinal de coorte aberto envolveu 1.326 indivíduos e as características da população estão descritas na Tabela 1. No geral, a população é composta por adultos jovens, com mediana de idade de 24 anos (intervalo interquartil: IQR, 13,9 – 40,0 anos). A proporção entre homens e mulheres foi equivalente de 1,1:1,0, respectivamente. O tempo de exposição à malária variou de 13 a 40 anos (IQR), com mediana de 24 anos, semelhante à idade dos indivíduos. Como esperado, observamos alta correlação entre idade e tempo de exposição à malária (correlação de Spearman, $r = 0,99$, $p < 0,0001$), uma vez que a maioria dos indivíduos são nativos da região Amazônica. O tempo de residência no município de Mâncio Lima foi de 8 a 29 anos (mediana de 16 anos). Além disso, a mediana de episódios prévios de malária relatados pelos indivíduos foi de três episódios (IQR, 1 – 6).

Tabela 1. Dados demográficos, epidemiológicos e imunológicos dos 1.326 indivíduos envolvidos no estudo populacional em Mâncio Lima, estado do Acre, Brasil.

Características	
Idade em anos, mediana (IQR)	24,0 (13,9 – 40,0)
Gênero, masculino:feminino	1,1:1,0
Anos de exposição à malária, mediana (IQR)	24,0 (13,0 – 40,0)
Anos de residência em Mâncio Lima, mediana (IQR)	16,0 (8,0 – 29,2)
Episódios prévios de malária, mediana (IQR)*	3 (1 - 6)
Prevalência de malária aguda, n (%)**	127 (9,6%)
<i>Plasmodium vivax</i>	94 (74,0%)
<i>Plasmodium falciparum</i>	33 (26,0%)
Resposta de anticorpos anti-PvDBP _{II} , n (%)***	299 (22,5%)

IQR – Intervalo interquartil.

* Episódios prévios de malária reportados pelos indivíduos.

** Diagnóstico por PCR em Tempo Real (Kimura et al., 1997).

*** Anticorpos IgG total anti-PvDBP_{II} detectados por ELISA.

5.2. Prevalência de malária e riscos associados à infecção

Na linha de base do indivíduo, a prevalência de malária na população foi de aproximadamente 10% (127/1.326), onde 74% (94/127) dos casos de malária foram causados por *P. vivax* e 26% (33/127) por *P. falciparum*. Nenhuma infecção mista foi detectada na população de estudo (Tabela 1).

Quando analisamos a frequência de malária em relação as variáveis demográficas (idade e gênero), epidemiológicas (tempo de exposição à malária, episódios prévios de malária, tempo de residência em Mâncio Lima) e ocupacionais, não houve associação com as variáveis gênero, idade e tempo de exposição à malária na população de estudo (Tabela 2). No entanto, apenas indivíduos que reportaram mais de seis malárias prévias tiveram associação com malária aguda (OR = 4,24, CI 95% = 1,35 - 13,26, $p = 0,014$). Além disso, o tipo de ocupação exercida pelos indivíduos mostrou associação com infecção por malária, ou seja, indivíduos que exerciam atividades de agricultura, pesca e exploração de madeira apresentaram maior chance de ter malária quando comparado aos que exerciam atividade no serviço público (OR = 5,71, IC 95% = 1,65 – 18,96, $p = 0,005$) (Tabela 2).

Por outro lado, após a construção do modelo de regressão logística múltipla, no qual foram inseridas variáveis com nível de significância menor ou igual a 10% ($p \leq 0,1$), apenas episódios prévios de malária permaneceu no modelo (aOR = 1,02, IC 95%: 1,01 - 1,04, $p = 0,003$).

Tabela 2. Fatores de risco associados à infecção por malária em 1.326 indivíduos recrutados no estudo de Mâncio Lima, estado do Acre, Brasil.

Variáveis	N	Infecção aguda por malária	
		OR (95% IC)*	P-valor
Gênero			
Feminino	669	1	0,630
Masculino	657	1,42 (0,55 – 3,70)	
Idade (anos)			
0 - 12	290	1	
13 - 24	385	1,28 (0,48 – 3,39)	0,810
25 - 40	327	1,00 (0,36 – 2,78)	1,000
> 40	324	1,57 (0,61 – 4,02)	0,480
Residência na região Amazônica (anos)			
0 - 12	301	1	
13 - 24	383	1,28 (0,48 – 3,38)	0,810
25 - 40	322	0,87 (0,30 – 2,48)	1,000
> 40	320	1,57 (0,61 – 4,02)	0,480
Episódios prévios de malária**			
0 – 1	425	1	
2 – 3	298	2,09 (0,61 – 7,17)	0,370
4 – 6	253	3,27 (1,02 – 10,5)	0,070
> 6	307	4,24 (1,35 – 13,26)	0,014
Ocupação			
Servidor Público***	98	1	
Agricultura, pesca e exploração de madeira	162	5,71 (1,65 - 18,96)	0,005
Desempregados	355	3,99 (1,17 – 13,67)	0,049
Estudantes	430	2,43 (0,65 – 8,83)	0,330
Outros serviços****	205	4,41 (1,34 – 14,95)	0,029

Dados estatisticamente significativos no nível de 5% ($p < 0,05$) em negrito.

* OR = *Odds ratio* calculado considerando intervalo de confiança de 95% (95% IC).

** Episódios prévios de malária reportados pelos indivíduos.

*** Servidor público – qualquer serviço fornecido pelo governo (municipal, estadual ou federal).

**** Outros serviços – atividades não listadas nesta tabela.

5.3 Resposta de anticorpos IgG naturalmente adquiridos contra a PvDBP_{II}

A resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} foi avaliada em 1.326 participantes pela sorologia convencional (ELISA) na linha de base do indivíduo. Deste total,

22,5% (299/1.326) foram respondedores para a PvDBP_{II} (Tabela 1). Em seguida, foi analisado se a resposta de anticorpos estava associada com variáveis demográficas e epidemiológicas da população de estudo. Pela análise univariada, não houve associação entre a resposta de anticorpos IgG total anti-PvDBP_{II} e as variáveis gênero e ocupação. Por outro lado, encontramos associação com a resposta de anticorpos e as variáveis idade, tempo de residência na região Amazônica, episódios prévios de malária e tempo desde a última malária (Tabela 3).

Em relação à idade, observamos que conforme a idade aumenta, há um risco crescente dos indivíduos apresentarem uma resposta positiva para a PvDBP_{II}, onde os indivíduos acima de 40 anos de idade apresentaram 3,7 vezes mais chance de ter resposta de anticorpos positiva quando comparado aos mais jovens (0 a 12 anos) (OR = 3,68, IC 95% = 1,68 – 8,05, p = 0,001). Resultados similares foram observados para o tempo de exposição à malária, pois conforme mencionado anteriormente, a idade e o tempo de exposição à malária possuem alta correlação. Também foi observado que há maiores chances do indivíduo apresentar anticorpos anti-PvDBP_{II} com o aumento do número de episódios de malária. Assim, indivíduos que tiveram mais de seis episódios de malária, apresentaram 8 vezes mais chance de ter resposta de anticorpos positiva em relação aos que tiveram apenas um episódio de malária (OR = 8,14, IC 95% = 3,42 – 19,40, p < 0,0001).

Além disso, indivíduos que tiveram malária recente, ou seja, há menos de seis meses, apresentaram três vezes mais chance de terem anticorpos (OR = 3,02, IC 95% = 1,61 - 5,67, p = 0,0007) quando comparado aos indivíduos que tiveram malária há mais de 6 meses. De fato, a frequência de anticorpos em indivíduos com malária recente foi de 43% (119/277) contra 20% (159/777) em indivíduos que tiveram malária há mais tempo ($\chi^2 = 53,2$, p < 0,0001). Isso demonstra que a infecção recente também influencia na frequência da resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II}.

Tabela 3. Fatores associados com a presença de anticorpos contra a PvDBP_{II} em 1.326 indivíduos envolvidos no estudo de Mâncio Lima, estado do Acre, Brasil.

Variáveis	N (%)	Anti-PvDBP	P-valor
		OR (95% IC)*	
Gênero			
Feminino	669 (50,5%)	1	
Masculino	657 (49,5%)	1,25 (0,65 – 2,43)	0,614
Idade (anos)			
0 - 12	290 (21,9%)	1	
13 - 24	385 (29,0%)	2,69 (1,21 – 5,99)	0,021
25 - 40	331 (25,0%)	3,33 (1,51 – 7,33)	0,003
> 40	320 (24,1%)	3,68 (1,68 – 8,05)	0,001
Residência na região Amazônica (anos)			
0 - 12	301 (22,7%)	1	
13 - 24	383 (28,9%)	2,68 (1,21 – 5,99)	0,021
25 - 40	325 (24,5%)	3,68 (1,68 – 8,05)	0,001
> 40	317 (23,9%)	3,50 (1,60 – 7,68)	0,002
Episódios prévios de malária**			
0 - 1	425 (32,1%)	1	
2 - 3	298 (22,5%)	3,32 (1,34 – 8,26)	0,012
4 - 6	253 (19,1%)	6,25 (2,60 – 15,01)	< 0,0001
> 6	307 (23,2%)	8,14 (3,42 – 19,40)	< 0,0001
Ocupação			
Servidor Público***	98 (7,4%)	1	
Agricultura, pesca e exploração de madeira	162 (12,2%)	1,80 (0,95 – 3,39)	0,086
Desempregados	355 (26,8%)	1,12 (0,57 – 2,12)	0,869
Estudantes	430 (32,4%)	0,59 (0,28 – 1,21)	0,207
Outros serviços****	205 (15,5%)	1,37 (0,73 – 2,63)	0,420
Tempo da última malária			
> 6 meses	777 (59,0%)	1	
Malária recente *****	277 (21,0%)	3,02 (1,61 – 5,67)	0,0007

Dados estatisticamente significativos no nível de 5% ($p < 0,05$) em negrito.

* OR = *Odds ratio* calculado considerando intervalo de confiança de 95% (95% IC).

** Episódios prévios de malária reportados pelos indivíduos.

*** Servidor Público - qualquer serviço fornecido pelo governo (municipal, estadual ou federal).

**** Outros Serviços - atividades não listadas nesta tabela.

***** Malária recente - novo episódio de malária ocorrido até seis meses.

Posteriormente, avaliamos a independência das variáveis associadas com a resposta de anticorpos IgG total contra a PvDBP_{II} pela análise de regressão logística múltipla. As variáveis que tiveram associação com a resposta de anticorpos anti-

PvDBP_{II} considerando nível de significância menor ou igual a 10% ($p \leq 0,1$) na análise univariada (idade, tempo de exposição à malária, episódios prévios de malária, ocupação e tempo da última malária) foram adicionadas ao modelo. Uma vez que observamos colinearidade, ou seja, alta correlação entre idade e o tempo de exposição à malária (correlação de Spearman, $r = 0,99$, $p < 0,0001$), apenas a variável idade foi incluída no modelo.

A figura 6 ilustra as variáveis que sobreviveram na análise multivariada. De fato, observamos que com o aumento da idade e episódios prévios de malária, há um aumento tanto da frequência quanto da intensidade da resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II}. Além disso, o modelo de regressão logística mostrou que a cada ano de vida do indivíduo, há 1% de chance do indivíduo apresentar resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} positiva (*Odds ratio* ajustado – aOR = 1,01, IC 95%: 1,00 - 1,02, $p = 0,007$). De forma similar, a cada novo episódio de malária, há 3% de chance do indivíduo apresentar resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} (aOR = 1,03, IC 95%: 1,01 – 1,04, $p = 0,005$). Também foi observado que o indivíduo que teve malária recente teve quase 3 vezes mais chance de ter resposta positiva para a PvDBP_{II} (aOR = 2,89, IC 95%: 2,11 – 3,94, $p < 0,0001$). Portanto, a malária recente influencia na frequência e intensidade da resposta, o que parece promover um incremento (*boost*) na resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II}.

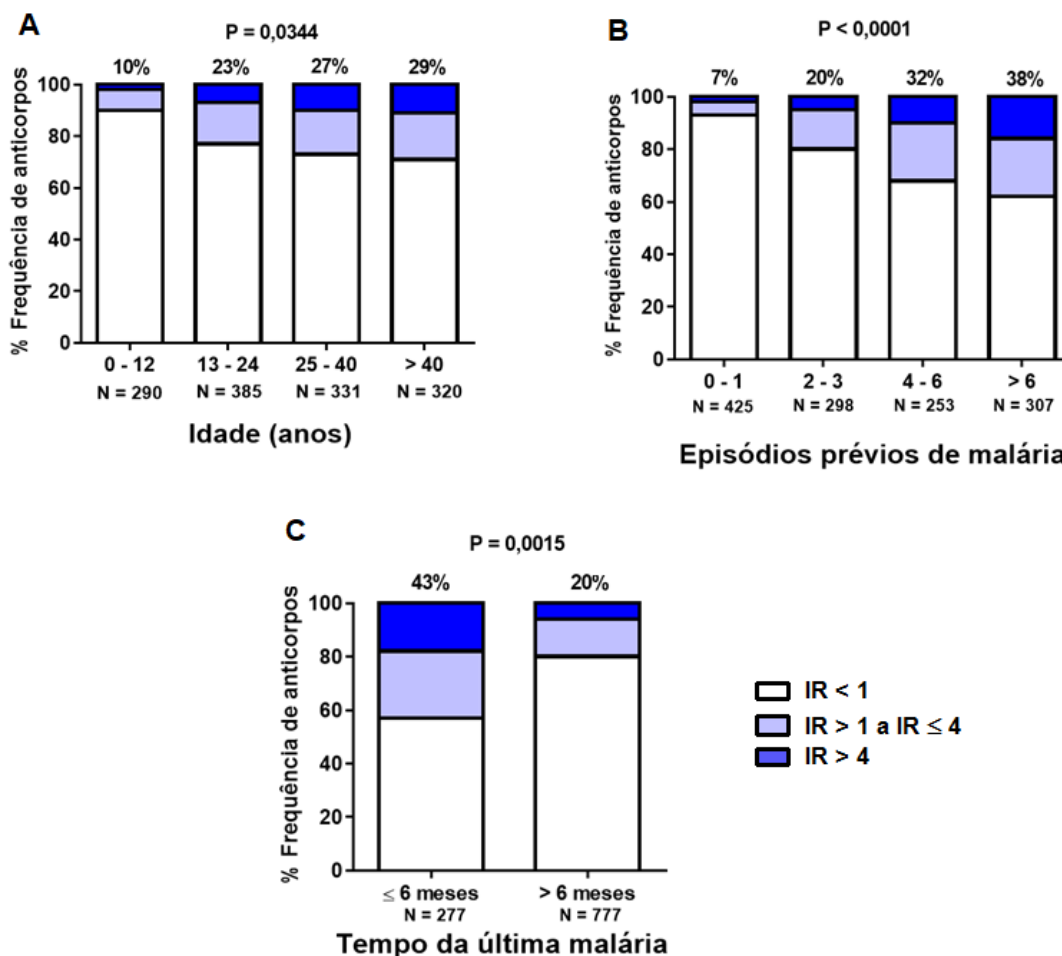


Figura 6: Variáveis independentemente associadas com a resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} em indivíduos do estudo de base populacional em Mâncio Lima, estado do Acre. **(A)** Frequência de resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} em relação à idade categorizada em anos; **(B)** Frequência de resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} em relação aos episódios prévios de malária categorizados; **(C)** Frequência de resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} em relação ao tempo desde a última malária categorizado em menor ou igual a 6 meses (malária recente) e mais de 6 meses. A resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} foi avaliada na linha de base do indivíduo pelo ELISA. Resultados foram expressos em porcentagem de respondedores para a PvDBP_{II} com Índice de Reatividade (IR) > 1 considerado positivo.

5.4 Dinâmica da infecção malárica e resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} no estudo longitudinal de 16 meses

Dos 1.326 indivíduos envolvidos no estudo longitudinal de coorte aberta, 1.110 participaram da linha de base do estudo, realizado em fevereiro de 2012, e 1.120 indivíduos participaram do segundo corte transversal realizado após 16 meses (junho de 2013).

Durante os 16 meses de estudo, o número de casos de malária na população estudada a cada mês, variou de 1 a 16 casos (Figura 7A). No período de novembro

de 2012 a fevereiro de 2013 foram notificados os maiores números de casos de malária, e ambas as espécies *P. vivax* e *P. falciparum* foram notificadas (SVS/MS, 2018). Além disso, este período coincide com o maior número de casos de malária causada pelo *P. falciparum*, no entanto, a espécie *P. vivax* foi a mais prevalente durante os 16 meses de acompanhamento. O menor número de casos de malária na população de estudo foi observado em agosto de 2012 e junho de 2013. No geral, observamos que a precipitação coincide com o número de casos de malária. Entretanto, no final do período de menor precipitação (junho de 2012 a outubro de 2012) houve o início do aumento dos casos de malária. Com o aumento da precipitação, houve o início da queda dos casos de malária notificados.

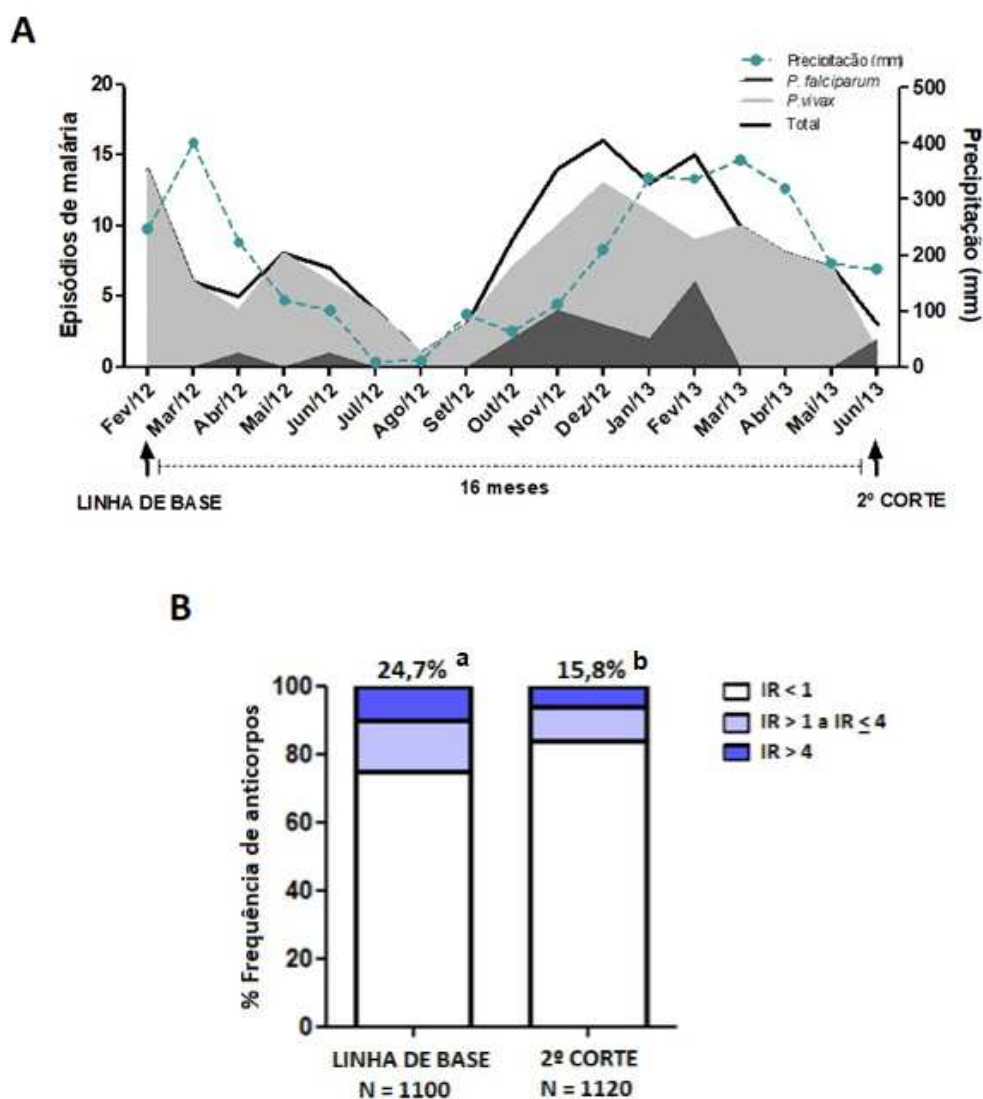


Figura 7. Distribuição temporal dos casos de malária e resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} na população estudada de Mâncio Lima, estado do Acre, Brasil (Fevereiro de 2012 a Junho de 2013). **(A)** Distribuição mensal dos episódios de malária de acordo com a precipitação ao longo dos 16

meses do estudo longitudinal; **(B)** Frequência de resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} detectados nos dois momentos do estudo: linha de base (fevereiro de 2012), e segundo corte transversal (junho de 2013). Os anticorpos foram detectados pela sorologia convencional de ELISA. Os resultados foram expressos em porcentagem de respondedores para a PvDBP_{II} com Índice de Reatividade (IR) > 1 considerado positivo. Fonte: casos de malária - SIVEP-Malária; Precipitação: INMET, 2016.

A resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} foi avaliada em dois momentos: (i) fevereiro de 2012 (linha de base), que foram incluídos 1.100 indivíduos, e (ii) 16 meses após o início do estudo longitudinal (junho de 2013), onde foram envolvidos 1.120 indivíduos. Na linha de base, a frequência de respondedores para a PvDBP_{II} foi de 24,7% (272/1.100) e, no segundo corte transversal houve uma redução significativa da frequência para 15,8% (177/1.120) ($\chi^2 = 27,4$; $p < 0.0001$). Além disso, observamos uma tendência de redução da intensidade de resposta (χ^2 de tendência = 26,01; $p < 0.0001$) (Figura 7B).

Observa-se que a linha de base do estudo foi realizada no início da queda do número de episódios de malária na população de estudo. Por outro lado, quando foi realizado o segundo corte transversal, o número de episódios de malária encontrava-se baixo (Figura 7A).

5.5 Características, incidência de malária e persistência de anticorpos contra a PvDBP_{II} em indivíduos acompanhados durante 16 meses

Dos 1.326 indivíduos envolvidos no estudo, 894 (67,4%) tiveram amostras pareadas, ou seja, participaram dos dois momentos do estudo (fevereiro de 2012 e junho de 2013). Desta forma, os 894 indivíduos foram acompanhados por 16 meses, o que representa 14.304 pessoas/mês de acompanhamento. Com base nos casos registrados de malária nesses indivíduos no período do estudo, a incidência de malária foi de 7,69 episódios por 1.000 pessoas/mês (intervalo de confiança de 95% - IC: 6,35 - 9,23/1.000 pessoas/mês), sendo 6,64 episódios por 1.000 pessoas/mês causados por *P. vivax* e 1,05 episódios por 1.000 pessoas/mês causados por *P. falciparum*.

A partir dos resultados da resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} na linha de base e no segundo corte transversal do estudo, foi possível identificar três perfis de resposta de anticorpos: (i) Não respondedor persistente (NRP) – indivíduos com resposta de anticorpos negativa na linha de base do estudo (tempo zero) e após 16 meses do início do estudo; (ii) Respondedor transiente (RT) – indivíduos cuja

resposta de anticorpos flutuou no período do estudo; (iii) Responder persistente (RP) - indivíduos com resposta de anticorpos positiva tanto no início do estudo (tempo zero) quanto após 16 meses. Do total dos indivíduos que tiveram amostras pareadas, 70,0% (626/894) foram categorizados como NRP, 17,5% (156/894) como RT e 12,5% (112/894) como RP.

Para avaliar quais os fatores que influenciam na aquisição e persistência da resposta de anticorpos, as características de cada grupo com perfis de resposta imune humoral anti-PvDBP_{II} distintos estão demonstradas na Tabela 4. A proporção entre os homens e as mulheres foi igual (1,0:1,0) para os três grupos. A mediana de idade do grupo RP foi maior (35 anos, IQR = 23,6 a 44,5) quando comparado com os grupos NRP (23,6 anos, IQR = 13,0 a 40,0) e TR (28,5 anos, IQR = 17,0 a 43,8) ($p < 0,001$). Devido ao fato da população estudada ser nativa da região amazônica, a mediana do tempo de exposição à malária foi equivalente à idade. Em relação ao tempo de residência em Mâncio Lima, o grupo NRP apresentou menor tempo (mediana de 16 anos, IQR = 9 - 28) quando comparado aos grupos RT (20 anos, IQR = 10 a 34 anos) e RP (28 anos, IQR = 15 a 39). Além disso, observamos que o número de episódios prévios de malária foi maior nos grupos RT e RP de 5 e 6 episódios, respectivamente, quando comparado ao grupo NRP ($p < 0,001$). Também houve diferença na frequência de malária aguda nos grupos, onde o grupo NRP teve uma frequência de 8,5% (53/626), seguido de 20,5% (32/156) e 22,3% (25/112) nos grupos RT e RP, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Dados demográficos e epidemiológicos dos grupos com perfis de resposta de anticorpos distintos contra a PvDBP_{II} em 894 indivíduos participantes do estudo longitudinal em Mâncio Lima, estado do Acre, Brasil.

Características	NRP n = 626 (70,0%)	RT n = 156 (17,5%)	RP n = 112 (12,5%)	P-valor
Mediana de idade, anos (IQR)	23,6 (13,0 – 40,0) ^A	28,5 (17,0 – 43,8) ^A	35,0 (23,6 – 44,5) ^B	< 0,0001
Gênero, masculino:feminino	1,0:1,0 ^A	1,0:1,0 ^A	1,0:1,0 ^A	1,000
Anos de exposição à malária, mediana (IQR)	23,0 (13,0 – 40,0) ^A	28,5 (17,0 – 43,0) ^A	35,0 (23,6 – 44,5) ^B	< 0,0001
Anos de residência em Mâncio Lima, mediana (IQR)	16,0 (8,8 -28,0) ^A	20,0 (10,0 – 34,1) ^B	27,5 (14,7 – 39,0) ^B	< 0,0001
Episódios prévios de malária, mediana (IQR)	2 (1 - 5) ^A	5 (3 - 9) ^B	6 (3 - 10) ^B	< 0,0001
Mediana do tempo da última malária, meses (IQR)	26,0 (12,0 – 60,0) ^A	12,0 (2,0 – 36,0) ^B	16,5 (3,0 – 48,0) ^B	< 0,0001
Casos de malária notificados*	53 (8,5%) ^A	32 (20,5%) ^B	25 (22,3%) ^B	< 0,0001

Diferença estatisticamente significativa em nível de 5% ($p < 0,05$) em negrito.

Letras diferentes correspondem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

IQR – Intervalo Interquartil.

NRP - Não respondedor persistente.

RT - Respondedor transiente.

RP - Respondedor persistente.

*Casos de malária notificados pelo SIVEP-Malária no período do estudo.

Quando avaliamos pela análise multivariada, as variáveis independentes associadas com a persistência de resposta de anticorpos positiva para a PvDBP_{II} (NRP vs RP) foram idade, episódios prévios de malária e ter tido malária recente (Figura 8).

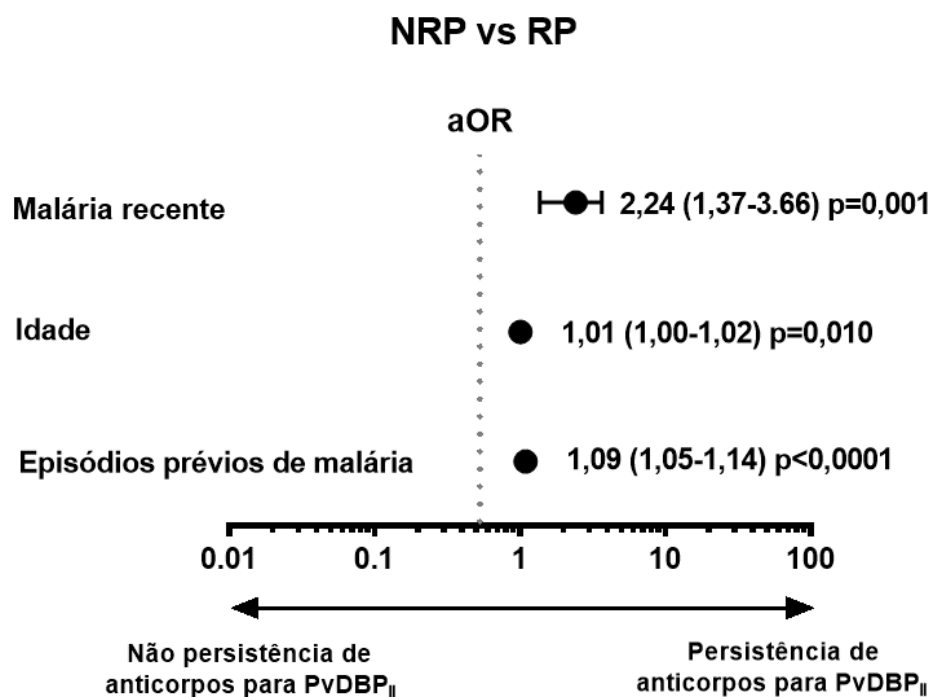


Figura 8: Variáveis independentemente associadas com a persistência de resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II}. Análise de *Odds ratio* realizado pelo modelo de regressão logística múltipla ajustado para as variáveis de confusão. Variáveis associadas com resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foram mantidos nos modelos finais.

Esses resultados em conjunto, sugerem que a exposição à malária refletida pelas variáveis idade, tempo de exposição à malária e episódios prévios de malária estão associados com a aquisição e persistência de anticorpos anti-PvDBP_{II}. Além disso, verificamos novamente que a malária recente promove um incremento (*boost*) na frequência e intensidade da resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II}.

6 DISCUSSÃO

A escolha de um antígeno vacinal contra a malária requer um entendimento profundo da resposta imune naturalmente adquirida aos diferentes antígenos do parasito em diferentes contextos epidemiológicos, demográficos e sociais (ADDAI-MENSAH et al., 2016; CASTRO et al., 2006; LIMA-JUNIOR et al., 2008, 2012; WERNSDORFER, 1981). Diversos estudos têm apontado proteínas de fase sanguínea do parasito envolvidas no processo de invasão dos eritrócitos como potenciais candidatas à vacina (LONGLEY et al., 2016). Entre essas proteínas, apenas a PvDBP encontra-se em fase clínica (THAM et al., 2017) e a importância dessa proteína como candidata é justificada devido ao seu papel em garantir o parasitismo na célula hospedeira, uma vez que indivíduos DARC negativos são naturalmente resistentes à infecção pelo *P. vivax* (MILLER et al., 1976). Além disso, já foi demonstrado que a PvDBP_{II} é naturalmente imunogênica em indivíduos expostos à malária (CERÁVOLO et al., 2005; MICHON; FRASER; ADAMS, 2000; ZAKERI et al., 2011). No entanto, estudos destacam a complexidade da resposta imune contra a PvDBP e a heterogeneidade da resposta de anticorpos em populações de diferentes regiões demográficas (FRASER et al., 1997; KANO et al., 2012; KING et al., 2008; SOUZA-SILVA et al., 2010). Nesse contexto, estudos longitudinais de base populacional com ênfase em estudos imunoepidemiológicos em diferentes populações, são importantes para a compreensão da imunidade naturalmente adquirida contra o principal candidato à vacina antimalárica.

No presente trabalho, foi avaliada a infecção por malária e a resposta imune humoral contra a PvDBP_{II} durante 16 meses de estudo em uma população da Amazônia brasileira, residentes na cidade de Mâncio Lima no estado do Acre. Além disso, avaliamos os fatores associados com a infecção, aquisição e persistência da resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II}. A população é composta por adultos jovens, com alta correlação entre a idade e o tempo de exposição à malária, portanto, nativos da Amazônia brasileira, sendo a maioria de origem no próprio estado do Acre. Embora os indivíduos sejam nativos da região Amazônica, foi observado que a mediana de episódios prévios de malária reportados foi de apenas três episódios, indicando pouca experiência com a doença.

A prevalência de malária nesta população de estudo foi de quase 10%, com ocorrência das duas espécies principais (*P. vivax* e *P. falciparum*). Como esperado, o *P. vivax* foi a espécie mais prevalente (74% dos casos) e tem sido a tendência nacional desde 1999 (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2016; WHO, 2016), embora nos últimos dois anos (2016 e 2017) houve um aumento dos casos de malária, principalmente devido ao *P. falciparum* (PAHO, 2017). A prevalência de malária na população de estudo corrobora com estudos em outras populações nativas da Amazônia que encontraram entre 10 e 14% de positividade por diagnóstico molecular (LADEIA-ANDRADE et al., 2009). De fato, o diagnóstico molecular tem auxiliado na detecção de infecções submicroscópicas e assintomáticas, sendo uma ferramenta importante para a detecção dos casos em áreas de baixa transmissão de malária e em programas de vigilância para os esforços no controle e eliminação da malária (BAUM et al., 2016; COSTA et al., 2014; FERREIRA; CASTRO, 2016; SIQUEIRA et al., 2016). Nos últimos anos, a região das Américas teve uma diminuição de 41% dos casos desde 2000 (CARTER et al., 2015; WHO, 2016) e esse perfil não é diferente do Brasil que reduziu em 89% os casos notificados nos últimos 15 anos (PENIDO, 2016). Essa redução foi resultado dos esforços da intensificação das medidas de controle de malária que incluíram o diagnóstico e tratamento precoce ocorrido a partir de 2000 (LOIOLA; SILVA; TAUIL, 2002; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Em Mâncio Lima, o perfil de transmissão acompanha a tendência nacional com redução dos casos de malária e predomínio de *P. vivax* (84,6%) até 2015 (SVS/MS, 2017) e um leve aumento de casos notificados nos últimos dois anos (SVS/MS, 2018).

Estudos em populações nativas da Amazônia mostraram que o risco de infecção, bem como da doença diminuiu com o aumento da idade, sugerindo que a exposição contínua aumenta a chance de adquirir imunidade contra o parasito e a doença (CAMARGO et al., 1996; LADEIA-ANDRADE et al., 2009). No entanto, no presente trabalho, não encontramos associação com malária aguda e variáveis que refletem tempo cumulativo de exposição à malária. Em nosso estudo, apenas os indivíduos que reportaram ter mais de seis episódios de malária na vida, tiveram o risco aumentado de infecção (OR = 4,24, p = 0,014). Apesar de não termos avaliado a localização da moradia do indivíduo, estudos anteriores mostraram que indivíduos residentes em área próximas ao igarapé tiveram risco aumentado de se infectar por

malária quando comparados aos residentes de área mais distantes do igarapé, denominada de ramal (KANO et al., 2012). Essas diferenças no padrão de transmissão são atribuídas à proximidade dos criadouros dos anofelinos (DE BARROS; HONÓRIO, 2007). Além disso, a heterogeneidade de transmissão de malária no município estudado já foi evidenciada, onde o maior número de casos de malária tem sido notificado nos bairros Cobal e Centro do município de Mâncio Lima (ARRUDA et al., 2016; SVS/MS, 2017). Dessa forma, a localização da moradia do indivíduo, embora não avaliada no presente estudo, pode propiciar maior exposição ao parasito da malária e, conseqüentemente, determinar um risco aumentado para a infecção malárica. Tal fato poderia explicar o motivo pelo qual os indivíduos avaliados neste trabalho, que tiveram maior número de episódios de malária, apresentaram maior risco de infecção.

Além disso, identificamos que indivíduos que exerciam atividades de agricultura, pesca e exploração de madeira apresentaram maior risco de infecção por malária (OR = 5,71, $p = 0,005$), o que sugere maior exposição à malária, inerente à atividade ocupacional exercida. De fato, já foi demonstrado que essas atividades ocupacionais propiciam maior exposição à malária devido à proximidade dos locais de reprodução do vetor anofelino (DOS REIS et al., 2015; MAHEU-GIROUX et al., 2010; OLSON et al., 2010). Portanto, a atividade ocupacional exercida pode conferir maior ou menor exposição à malária, o que pode determinar o risco aumentado ou diminuído dos indivíduos se infectarem por malária.

Em relação à resposta de anticorpos, cerca de 23% dos indivíduos apresentaram resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} positiva, o que corrobora com outro estudo de base populacional realizado no estado do Acre, que encontrou aproximadamente 20% de positividade (SOUZA-SILVA et al., 2010). Outros estudos realizados em populações da Amazônia brasileira, mostraram uma variação da frequência de respondedores à PvDBP_{II} de 19 a 60% dependendo da população e da área estudada (KANO et al., 2012; NICOLETE et al., 2016; SOUZA-SILVA et al., 2010; Cassiano et al., 2016). A baixa imunogenicidade também foi observada em uma população da Colômbia, onde menos de 40% foram respondedores à PvDBP_{II} (MAESTRE et al., 2010; MICHON et al., 1998). O perfil da resposta de anticorpos é um pouco diferente em populações de regiões hiperendêmicas para a malária, como

na Papua Nova Guiné, onde a frequência de resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} varia de 60 a 80% de resposta (FRASER et al., 1997; KING et al., 2008; TRAN et al., 2005).

A variação da frequência de resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} é explicada, em parte, pelo tempo e intensidade de exposição ao parasito, bem como a idade, que são fatores preditores para a positividade para a PvDBP_{II} (CERÁVOLO et al., 2005; KANO et al., 2012; LANGHORNE et al., 2008; NICOLETE et al., 2016; SOUZA-SILVA et al., 2010). De fato, no presente trabalho, observamos que a idade, o número de episódios prévios e malária recente foram preditores para a positividade à PvDBP_{II}. Como esperado, nesta população nativa da Amazônia, a idade foi associada à frequência de anticorpos anti-PvDBP_{II}, onde a cada ano de vida do indivíduo, houve 1% de chance do indivíduo ter resposta de anticorpos positiva. Estes resultados corroboram com um estudo realizado em uma população nativa de assentamento agrícola do interior do Amazonas, onde a cada ano de vida do indivíduo houve 5% de chance de apresentar anticorpos anti-PvDBP_{II} (KANO et al., 2012). Estudos em comunidades com alta endemicidade como a Papua Nova Guiné, sugerem um possível *boost* da resposta imune devido à exposição cumulativa equivalente ao aumento da idade (FRASER et al., 1997; MICHON et al., 2000; XAINLI et al., 2003).

Sabe-se que a imunidade naturalmente adquirida contra a malária é estabelecida após repetidas exposições ao parasito e na ausência de exposição, há uma redução dessa imunidade (CROMPTON et al., 2010; LANGHORNE et al., 2008; MARSH; KINYANJUI, 2006). Mais especificamente à resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II}, foi demonstrado que anticorpos aumentam significativamente em indivíduos que tiveram mais de 10 episódios de malária (SOUZA-SILVA et al., 2010). No presente estudo, foi observado que a cada novo episódio de malária, há 3% de chance do indivíduo apresentar anticorpos anti-PvDBP_{II}. Além disso, os indivíduos que tiveram malária recente tiveram mais chance de ter anticorpos contra a PvDBP_{II} e maior intensidade da resposta quando comparado aos indivíduos que tiveram malária há mais tempo. Isso demonstra que a infecção recente e contínua exposição ao parasito é importante tanto para a positividade e persistência da resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II}. Portanto, a idade, bem como as variáveis que refletem

tempo cumulativo de exposição, foram variáveis associadas com a positividade de resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} nesta população de estudo.

Devido à escassez de estudos longitudinais que envolvam um grande número de indivíduos para avaliação da imunidade naturalmente adquirida aos antígenos de *P. vivax*, foi realizado um novo inquérito após 16 meses para avaliar a resposta de anticorpos anti-PvDBP_{II} nesta população nativa da Amazônia. Após 16 meses do início do estudo, houve uma queda da frequência de respondedores para PvDBP_{II} de 24,7 para 15,8%, inclusive na intensidade da resposta. Se observamos a distribuição temporal dos episódios de malária ao longo dos 16 meses, os maiores números de episódios de malária foram observados no início do estudo, sendo que após 16 meses o número de infecções foi bem mais baixo. Essa distribuição temporal dos casos de malária acompanha o perfil da Amazônia, onde há um período de menor precipitação, com o início do aumento dos casos de malária e outro período de maior precipitação com queda no número de casos (CAMARGO et al., 1996, 1994b; FERRARONI; HAYES, 1979; SALCEDO et al., 2000). Desta forma, a dinâmica dos casos de malária na população estudada no período pode ser uma possível explicação da redução significativa de respondedores para a PvDBP_{II}. De fato, um recente estudo acompanhou a resposta de anticorpos contra mais de 300 proteínas de *P. vivax* em três regiões diferentes, sendo duas com baixa transmissão (Brasil e Tailândia), e mostrou que na ausência de infecção, para a maioria dos antígenos a resposta de IgG é de curta duração, sendo que a meia-vida de anticorpos foi menor que 6 meses (LONGLEY et al., 2017). Assim, esses dados reforçam a necessidade de uma exposição contínua ao parasito para manutenção dos anticorpos contra a PvDBP_{II}.

Em relação a persistência de anticorpos anti-PvDBP_{II} na população de estudo, somente 12,5% dos indivíduos mantiveram resposta de anticorpos após 16 meses. Esse resultado já era esperado, uma vez que a população é composta por adultos jovens (mediana de 24 anos) e, assim como para a positividade, as variáveis que refletem exposição cumulativa à malária (idade, número de episódios prévios de malária e malária recente) também foram preditoras para a persistência de anticorpos contra a PvDBP_{II} nesta população. Esses resultados reforçam que a exposição à malária é importante para a persistência de anticorpos contra vários

antígenos de *P. vivax* (LONGLEY et al., 2017), bem como para a PvDBP_{II} (NICOLETE et al., 2016).

De fato, a resposta de anticorpos contra antígenos de *P. vivax* tende a ser de vida-longa em indivíduos sob intensa exposição (LONGLEY et al., 2017). Nossos resultados estão de acordo, pois indivíduos que tiveram uma resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} persistente em 16 meses de acompanhamento, apresentaram maior tempo de exposição à malária (idade mais elevada), maior número de episódios prévios de malária e a maior parte tiveram malária aguda há menos de seis meses. Embora no presente trabalho não mostramos, de fato, indivíduos do grupo respondedor transiente que no início do estudo apresentaram resposta positiva para a PvDBP_{II} e após 16 meses deixaram de apresentar anticorpos anti-PvDBP_{II}, não tiveram infecção por malária no período estudado ou tiveram malária apenas no início do estudo. Assim, esses resultados reforçam que a resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} requer uma re-exposição para manutenção da resposta.

A maioria dos indivíduos (70%) desta população de Mâncio Lima acompanhados durante 16 meses, em nenhum momento apresentou resposta de anticorpos positiva contra a PvDBP_{II}. Apesar de serem indivíduos com menor tempo cumulativo de exposição à malária, esses resultados reforçam a baixa imunogenicidade da PvDBP_{II}, que tem sido discutida em vários trabalhos, pois boa parte dos indivíduos não são capazes de montar uma resposta de anticorpos contra essa proteína (CERÁVOLO et al., 2005; MICHON et al., 1998; SOUZA-SILVA et al., 2010), mesmo em populações de áreas de alta endemicidade para malária (COLETOBIAN et al., 2009). A baixa imunogenicidade dessa proteína pode ser explicada pela própria característica biológica da proteína (rápida exposição ao sistema imune (ADAMS et al., 1990; WERTHEIMER; BARNWELL, 1989), pela alta variabilidade da PvDBP_{II} entre os isolados de *P. vivax* (SOUSA et al., 2011; MCHENRY; ADAMS, 2006; SOUSA et al., 2010), pelos anticorpos bloqueadores da interação PvDBP-DARC serem variante-específico (CERAVOLO et al., 2009) e pelos polimorfismos genéticos do hospedeiro, como o receptor DARC e alelos de HLA de classe II (KANO et al., 2016; MAESTRE et al., 2010; SOUZA-SILVA et al., 2014).

Dessa forma, a baixa imunogenicidade desta proteína constitui um grande desafio para o desenvolvimento de uma vacina com base na PvDBP_{II}. No entanto,

apesar da baixa imunogenicidade, alguns estudos mostraram que alguns indivíduos tem a capacidade de desenvolver uma resposta de anticorpos totais e, principalmente funcionais (bloqueadores da interação DBPII-DARC), contra a PvDBP_{II} que tende a ser duradoura e com ampla reatividade às diversas variantes (CERAVOLO et al., 2008; NICOLETE et al., 2016). Além disso, para melhorar o desenvolvimento de uma vacina baseada nesta proteína, um novo protótipo vacinal (DEKnull2) com alteração nos polimorfismos da região II, induziu uma resposta neutralizante com ampla reatividade às diferentes variantes e fortemente reconhecida em indivíduos expostos à malária (NTUMNGIA et al., 2017).

Em resumo, os resultados encontrados corroboram com estudos que sugerem que o tempo de exposição e histórico de malária são fatores determinantes para a aquisição e persistência de anticorpos anti-PvDBP_{II}. Acredita-se que esse estudo de base populacional realizado em uma população nativa da Amazônia e com um grande número de indivíduos, poderá contribuir para os esforços direcionados ao entendimento da resposta de anticorpos naturalmente adquiridos contra o principal candidato à vacina antimalárica.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A prevalência de malária foi de cerca de 10% com predomínio da espécie *P. vivax*;
- Episódios prévios de malária e ocupação foram riscos associados à infecção por malária, embora variáveis de confusão como localização da moradia não foram analisadas;
- A frequência de respondedores à PvDBP_{II} foi de cerca de 20% na população nativa de Mâncio Lima estudada, o que corrobora com outros estudos em populações da Amazônia;
- A resposta de anticorpos contra a PvDBP_{II} teve uma redução significativa para 15% após 16 meses, o que coincide com a redução dos casos de malária aguda na população e no período estudado;
- As variáveis idade, o número de episódios prévios de malária e a malária recente foram preditores para a presença e persistência de anticorpos anti-PvDBP_{II};
- Apenas 12% dos indivíduos acompanhados durante 16 meses tiveram resposta de anticorpos persistente contra a PvDBP_{II}.

REFERÊNCIAS

- ACRE, G. DO E. DO. State program of ecological-economical assessment of state of Acre. **Rio Branco: Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Naturais**, p. 358, 2010.
- 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.
- ADAMS, J. H. et al. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 15, p. 7085–7089, 1992.
- ADDAI-MENSAH, O. et al. Acquired immune responses to three malaria vaccine candidates and their relationship to invasion inhibition in two populations naturally exposed to malaria. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2016.
- AMINO, R. et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**, v. 12, n. 2, p. 220–224, 2006.
- ARRUDA, E. F. DE et al. [Association between malaria and anemia in an urban area with Plasmodium transmission: Mâncio Lima, Acre State, Brazil]. **Cadernos de saúde pública**, v. 32, n. 9, p. e00115514, 2016.
- BARILLAS-MURY, C.; KUMAR, S. Plasmodium-mosquito interactions: A tale of dangerous liaisons. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1539–1545, 2005.
- BATCHELOR, J.; ZAHM, J.; TOLIA, N. Dimerization of Plasmodium vivax DBP is induced upon receptor binding and drives recognition of DARC. **Nat Struct Mol Biol.**, v. 4, n. 1, p. 139–148, 2012.
- BAUM, E. et al. Common asymptomatic and submicroscopic malaria infections in Western Thailand revealed in longitudinal molecular and serological studies: A challenge to malaria elimination. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2016.
- BEESON, J. G.; CRABB, B. S. Towards a Vaccine against Plasmodium vivax Malaria. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 12, 2007.
- BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: A molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, 2017.
- CAMARGO, L. et al. Hypoendemic Malaria in Rondonia (Brazil, Western Amazon Region): Seasonal Variation and Risk Groups in an Urban Locality. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 1, p. 32–38, 1 jul. 1996.
- CAMARGO, L. M. A. et al. Unstable Hypoendemic Malaria in Rondonia (Western Amazon Region, Brazil): Epidemic Outbreaks and Work-Associated Incidence in an Agro-Industrial Rural Settlement. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 1, p. 16–25, 1 jul. 1994a.
- CAMARGO, L. M. A. et al. Unstable Hypoendemic Malaria in Rondonia (Western

Amazon Region, Brazil): Epidemic Outbreaks and Work-Associated Incidence in an Agro-Industrial Rural Settlement. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 1, p. 16–25, 1 jul. 1994b.

CARTER, K. H. et al. Malaria in the Americas: Trends from 1959 to 2011. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 2, p. 302–316, 2015.

CASSIANO, G. C. et al. Impact of population admixture on the distribution of immune response co-stimulatory genes polymorphisms in a Brazilian population. **Human Immunology**, v. 76, n. 11, p. 836–842, 2015.

CASTRO, M. C. D. et al. Malaria risk on the Amazon frontier. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 7, p. 2452–2457, 2006.

CAVASINI, C. E. et al. Frequencies of ABO, MNSs, and Duffy phenotypes among blood donors and malaria patients from four Brazilian Amazon areas. **Human biology**, v. 78, n. 2, p. 215–9, 2006.

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, n. 10, p. 1042–1044, 2007.

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.

CERÁVOLO, I. P. et al. Anti-Plasmodium vivax duffy binding protein antibodies measure exposure to malaria in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 6, p. 675–681, 2005.

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, 2009.

COSTA, D. C. et al. Submicroscopic malaria parasite carriage: How reproducible are polymerase chain reaction-based methods? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 1, p. 21–28, 2014.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 755–766, 2006.

COX SINGH, J. et al. Plasmodium knowlesi Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. 165–171, 2008.

CROMPTON, P. D. et al. A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray. **Proceedings of**

the **National Academy of Sciences**, v. 107, n. 15, p. 6958–6963, 2010.

CROMPTON, P. D. et al. Mysteries of a Deadly Infectious Disease. **Annu Rev Immunol.**, v. 32, p. 157–187, 2014.

CRUZ MARQUES, A. Human migration and the spread of malaria in Brazil. **Parasitology Today**, v. 3, n. 6, p. 166–170, 1987.

DE BARROS, F. S. M.; HONÓRIO, N. A. Man biting rate seasonal variation of malaria vectors in Roraima, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 299–302, 2007.

DEANE, L. M. Malaria Studies and Control in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 38, n. 2, p. 223–230, 1 mar. 1988.

DE PINA-COSTA, A. et al. Malaria in Brazil: What happens outside the Amazonian endemic region. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 618–633, 2014.

DE SOUSA, T. N.; CARVALHO, L. H.; DE BRITO, C. F. A. Worldwide genetic variability of the duffy binding protein: Insights into Plasmodium vivax vaccine development. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–8, 2011.

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired immunity to Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 13–36, 2009.

DOS REIS, I. C. et al. Epidemic and endemic malaria transmission related to fish farming ponds in the Amazon Frontier. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 2015.

FANG, X. et al. Cloning of the Plasmodium vivax Duffy receptor. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 125–132, 1991.

FERRARONI, J. J.; HAYES, J. Aspectos epidemiológicos da malária no Amazonas. v. 9, n. 3, p. 471–480, 1979.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2016.

FRASER, T. et al. Expression and serologic activity of a soluble recombinant Plasmodium vivax duffy binding protein. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2772–2777, 1997.

GAMAGE-MENDIS, A. C. et al. Characteristics of Malaria Transmission in Kataragama, Sri Lanka: A Focus for Immuno-Epidemiological Studies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 4, p. 298–308, 1 abr. 1990.

GHANI, A. C. et al. Loss of population levels of immunity to malaria as a result of exposure-reducing interventions: Consequences for interpretation of disease trends. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, 2009.

GOSI, P. et al. Polymorphism patterns in Duffy-binding protein among Thai Plasmodium vivax isolates. **Malaria Journal**, v. 7, p. 1–8, 2008.

- GRIMBERG, B. T. et al. Plasmodium vivax invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1940–1948, 2007.
- GRUSZCZYK, J. et al. Transferrin receptor 1 is a reticulocyte-specific receptor for Plasmodium vivax. **Science**, v. 359, n. 6371, p. 48–55, 2018.
- GUEIRARD, P. et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 43, p. 18640–5, 2010.
- GUNALAN, K. et al. Role of *Plasmodium vivax* Duffy-binding protein 1 in invasion of Duffy-null Africans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 22, p. 6271–6276, 2016.
- HOLZ, L. E.; FERNANDEZ-RUIZ, D.; HEATH, W. R. Protective immunity to liver-stage malaria. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 10, p. e105, 2016.
- IBGE, I. B. DE G. E. E. **Population Census: Synopsis Acre, Mâncio Lima.**
- IMWONG, M. et al. Numerical Distributions of Parasite Densities during Asymptomatic Malaria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 8, p. 1322–1329, 2016.
- 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. The Presence, Persistence and Functional Properties of Plasmodium vivax Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1–21, 2016.
- KHO, W. G. et al. Analysis of polymorphic regions of Plasmodium vivax Duffy binding protein of Korean isolates. **Korean Journal of Parasitology**, v. 39, n. 2, p. 143–150, 2001.
- KIMURA, M. et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitology International**, v. 46, n. 2, p. 91–95, 1997.
- 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.
- 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. 1–11, 30 dez. 1985.
- LADEIA-ANDRADE, S. et al. Age-Dependent Acquisition of Protective Immunity to Malaria in Riverine Populations of the Amazon Basin of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 3, p. 452–459, 1 mar. 2009.

- LANGHORNE, J. et al. Immunity to malaria: more questions than answers. **Nature Immunology**, v. 9, n. 7, p. 725–732, 2008.
- LAPOUBLE, O.; SANTELLI, A.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira, 2003 a 2012. **Revista panamericana de salud pública**, v. 38, n. 4, p. 300–6, 2015.
- LIMA-JUNIOR, J. et al. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to Plasmodium vivax merozoite surface protein 9 in Northwestern Amazon individuals. **Vaccine**, p. 1–23, 2008.
- LIMA-JUNIOR, J. C. et al. Influence of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles on IgG antibody response to the P. vivax MSP-1, MSP-3 α and MSP-9 in individuals from Brazilian endemic area. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–10, 2012.
- LINS, T. C. et al. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty eight ancestry informative SNPs. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n. 2, p. 187–192, 2010.
- LOIOLA, C.; SILVA, C. DA; TAUIL, P. [Malaria control in Brazil: 1965 to 2001]. **Rev Panam Salud Publica**, 2002.
- LONGLEY, R. J. et al. Naturally acquired antibody responses to more than 300 Plasmodium vivax proteins in three geographic regions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1–15, 2017.
- 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.
- MAESTRE, A. et al. Acquired antibody responses against Plasmodium vivax infection vary with host genotype for duffy antigen receptor for chemokines (DARC). **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. 1–11, 2010.
- MAHEU-GIROUX, M. et al. Risk of malaria transmission from fish ponds in the Peruvian Amazon. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 112–118, 2010.
- MANTA, F. S. N. et al. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. **Annals of Human Biology**, v. 40, n. 1, p. 94–98, 2013.
- MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 1–2, p. 51–60, 2006.
- MARTINS, A. C. et al. Clustering symptoms of non-severe malaria in semi-immune Amazonian patients. **PeerJ**, v. 3, p. e1325, 2015.
- MCHENRY, A. M.; ADAMS, J. H. The crystal structure of Plasmodium knowlesi DBPa DBL domain and its implications for immune evasion. **Trends Biochem Sci.**, v. 27, n. 4, p. 339–351, 2006.
- MEIBALAN, E.; MARTI, M. The biology of malaria transmission. **Recent Advances in Malaria**, p. 87–124, 2016.

MENARD, D. et al. Plasmodium vivax clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 13, p. 5967–5971, 2010.

MÉNARD, R. et al. Looking under the skin: The first steps in malarial infection and immunity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 701–712, 2013.

MICHON, P. A. et al. Serologic responses to recombinant Plasmodium vivax Duffy binding protein in a Colombian village. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 4, p. 597–599, 1998.

MICHON, P.; FRASER, T.; ADAMS, J. H. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the Plasmodium vivax Duffy binding protein. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3164–3171, 2000.

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.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, ano de 2006. **Bol. Epidemiol.**, p. 2, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, ano de 2007. **Bol. Epidemiol.**, p. 2, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. [s.l.: s.n.].

MOTA, M. M. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. **Science**, v. 291, n. January, p. 141–144, 2001.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 555–566, 2009.

NIANGALY, A. et al. Plasmodium vivax Infections over 3 Years in Duffy Blood Group Negative Malians in Bandiagara, Mali. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 744–752, 2017.

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.

NJAU, M. N.; JACOB, J. The enigma of memory B cells in malaria. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 12, p. 3146–3149, 2012.

NTUMNGIA, F. B. et al. Conserved and variant epitopes of Plasmodium vivax duffy binding protein as targets of inhibitory monoclonal antibodies. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 3, p. 1203–1208, 2012.

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. 1–5, 2016.

NTUMNGIA, F. B. et al. An engineered vaccine of the Plasmodium vivax Duffy binding protein enhances induction of broadly neutralizing antibodies. **Scientific**

Reports, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

OH, S. S.; CHISHTI, A. H. Host Receptors in Malaria Merozoite Invasion BT - Malaria: Drugs, Disease and Post-genomic Biology. In: COMPANS, R. W. et al. (Eds.). . Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 203–232.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview **Open. Malaria Journal**, 2010.

OLSON, S. H. et al. Deforestation and malaria in Mâncio Lima county, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 1108–1115, 2010.

ONG'ECHA, J. M. et al. Parasitemia, anemia, and malarial anemia in infants and young children in a rural holoendemic *Plasmodium falciparum* transmission area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 3, p. 376–385, 2006.

PAHO. Pan American Health Organization. **World Health Organization**, 2017.

PENIDO, A. Brasil registra o menor número de casos de malária nos últimos 35 anos. **Portal da Saúde**, 2016.

PETTER, M.; DUFFY, M. F. Antigenic Variation in *Plasmodium falciparum*. In: HSU, E.; DU PASQUIER, L. (Eds.). . **Pathogen-Host Interactions: Antigenic Variation v. Somatic Adaptations**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 47–90.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: The *Plasmodium* liver stage. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 849–856, 2006.

RANJAN, A.; CHITNIS, C. E. Mapping regions containing binding residues within functional domains of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi* erythrocyte-binding proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 24, p. 14067–14072, 1999.

RODRIGUES, M. H. C. et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 185–192, 2005.

RYAN, J. R. et al. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in Western Kenya. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 4, p. 575–581, 2006.

SALCEDO, J. M. et al. Malaria control in an agro-industrial settlement of Rondônia (Western Amazon region, Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 2, p. 139–145, 2000.

SAÚDE, M. DA. Malária: Monitoramento dos casos no Brasil em 2014. **Boletim Epidemiológico n.25**, v. 46, p. 5, 2015.

SINGH, S. K. et al. Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. **Biochemical Journal**, v. 374, n. 1, p. 193–198, 2003.

- SIQUEIRA, A. M. et al. Plasmodium vivax landscape in Brazil: Scenario and challenges. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. Suppl 6, p. 87–96, 2016.
- SOUSA, T. N. et al. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among Plasmodium vivax isolates from the Brazilian Amazon area. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, n. 2, p. 251–254, 2006.
- SOUSA, T. N. et al. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian Plasmodium vivax populations. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 334, 2010.
- 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.
- 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.
- STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 2006.
- SUH, I. B. et al. The analysis of Plasmodium vivax Duffy receptor binding domain gene sequence from resurgent Korea isolates. **Parasitology research**, v. 87, n. 12, p. 1007–10, 2001.
- SVS/MS. SIVEP Malária - Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2018.
- SVS/MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. SIVEP Malária - Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2017.
- THAM, W. H.; BEESON, J. G.; RAYNER, J. C. Plasmodium vivax vaccine research – we've only just begun. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 2–3, p. 111–118, 2017.
- TRAN, T. M. et al. Comparison of IgG reactivities to Plasmodium vivax merozoite invasion antigens in a Brazilian Amazon population. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 244–255, 2005.
- VANBUSKIRK, K. M. et al. Antigenic Drift in the Ligand Domain of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein Confers Resistance to Inhibitory Antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 9, p. 1556–1562, 2004.
- VLACHOU, D. et al. The developmental migration of Plasmodium in mosquitoes. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 16, n. 4, p. 384–391, 2006.
- WERNSDORFER, W. H. Prospects for the development of malaria vaccines. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 59, n. 3, p. 335–341, 1981.
- WERTHEIMER, S. P.; BARNWELL, J. W. Plasmodium vivax interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: Identification of a parasite receptor-like protein. **Experimental Parasitology**, v. 69, n. 3, p. 340–350, 1989.

WHITE, G. B. Essential malariology (2nd edition). **Parasitology Today**, v. 2, n. 1, p. 28, 30 dez. 2017.

WHO. **World Malaria Report**. Geneva: 2016.

WHO. **World Malaria Report**. Geneva: 2017.

WIN, T. T. et al. Wide distribution of *Plasmodium ovale* in Myanmar. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, n. 3, p. 231–239, 2002.

WIPASA, J. et al. Long-lived antibody and B cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, 2010.

XAINLI, J. et al. Epitope-Specific Humoral Immunity to. **Society**, v. 71, n. 5, p. 2508–2515, 2003.

YAMAUCHI LUCY M., L. M. et al. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 1215–1222, 2007.

ZAKERI, S. et al. Antibody responses and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium vivax* duffy binding protein (PvDBP) antibodies in individuals from an area with unstable malaria transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 6, p. 944–950, 2011.