UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Análise da resposta imune induzida pela imunização
experimental com antígenos recombinantes de
*Plasmodium vivax***

Mayne de Oliveira Pereira

Dissertação para obtenção do título de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2012

Mayne de Oliveira Pereira

**Análise da resposta imune induzida pela imunização
experimental com antígenos recombinantes de
*Plasmodium vivax***

Tese apresentada à Faculdade
de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Mestre.

Orientação: Profa. Dra. Irene
da Silva Soares.

São Paulo
2012

Mayne de Oliveira Pereira

**Análise da resposta imune induzida pela imunização
experimental com antígenos recombinantes de
*Plasmodium vivax***

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE.

Presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2012.

Trabalho realizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro concedido pela FAPESP, CNPq-INCTV e bolsa da CAPES.

Agradecimentos

Primeiramente à Deus pela força e inspiração.

Gostaria de agradecer à Professora Dra. Irene da Silva Soares pela oportunidade de ingresso na área da pesquisa científica e também pela confiança depositada em mim.

Agradeço aos professores que participaram da minha banca de qualificação Dr. Sandro Rogério de Almeida, Dr. Marcelo Urbano Ferreira e Dr. Cláudio Romero Farias Marinho pelas opiniões e sugestões dadas.

Aos Professores Cláudio Ribeiro e Maria de Fátima pelo excelente trabalho na coordenação do Seminário Laveran & Deane, onde pude aprender de forma intensiva sobre todos os temas relacionados à malária.

Aos pesquisadores do Instituto Butantan Dra Isabel Correia Batista e Dr. Rafael Marques Porto pelas análises das amostras das proteínas utilizadas no meu trabalho em RP-HPLC.

À professora Silvia Boscardin pelas explicações fornecidas e por fornecer o adjuvante Poly I:C utilizado em meu trabalho.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação Ana, Dora, Sueli, Edna, Jorge e Elaine pelos serviços prestados e pelo ótimo atendimento. Muito obrigada pela compreensão.

Às queridas Dona Márcia e Rose por manter sempre o laboratório limpo e bem arrumado e também pela amizade.

Às funcionárias do biotério Fátima e Lívia, muito obrigada pela fundamental ajuda fornecida com os muitos camundongos que tive ao longo desse trabalho e também muito obrigada pela compreensão.

Gostaria de agradecer a todos os professores do departamento de Análises Clínicas e seus alunos, pela disponibilidade e pelo empréstimo de equipamentos e reagentes.

Gostaria também de agradecer à amizade e o carinho da Fabiana e Juliana do laboratório de Microbiologia e da Marcela do laboratório de Bioquímica.

Gostaria de fazer um agradecimento especial às meninas do laboratório de Parasitologia pela sincera amizade, compreensão e ensinamentos fornecidos. À Kátia e Elaine por sempre estarem dispostas a me orientar e ensinar. À Amanda, por me receber de braços abertos e pelos ensinamentos fornecidos. À Victoria pelo exemplo de vida que é. À minha querida Patrícia, com você por perto tudo ficou mais fácil e divertido, muito obrigada pela sincera amizade e ajuda que você sempre me

ofereceu. À Luciana Lima. Às meninas de iniciação científica que estiveram presentes nesse período no laboratório Paula, Tati, Ticiane, Mariana e Montse.

Gostaria de agradecer à minha querida família.

Agradeço muito por ter tido a oportunidade de conviver e fazer parte da vida da minha querida madrinha Sueli Person. Não tenho palavras para descrever o que você é na minha vida e com certeza na vida de muitas pessoas e crianças.

Gostaria de registrar a minha imensa gratidão e amor aos meus pais João Luiz Pereira e Roseli de Oliveira Pereira. Se não fossem vocês nada disso seria possível, muito obrigada por apostarem sempre em mim, sempre me colocando em ótimos colégios, cursos e faculdade. Obrigada por me apoiarem em todas as minhas decisões, por me ajudarem sempre não só com conselhos, mas principalmente com exemplos. Um dia espero conseguir retribuir tudo isso. Gostaria de agradecer à minha irmã Larissa e minha doce e querida sobrinha Lara Beatriz pelo carinho. Amo vocês família.

Gostaria de agradecer ao meu noivo Alexandre pelo carinho, amor, compreensão e dedicação. Agradeço muito por você fazer parte da minha vida, Te Amo.

Gostaria de agradecer ao carinho que eu sempre recebi dos meus sogros Ilza e Bartoloneu, das minhas cunhadas Jaqueline e Elizabete, dos meus cunhados Silvio e Fábio, e dos queridos Vitor, Mariana, Camilly e meu afilhado Gabriel.

*“Mas se desejarmos fortemente o melhor e,
principalmente, lutarmos pelo melhor...
O melhor vai se instalar em nossa vida.
Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e
não do tamanho da minha altura”
Carlos Drummond de Andrade*

RESUMO

PEREIRA, M.O. Análise da resposta imune induzida pela imunização experimental com antígenos recombinantes de *Plasmodium vivax*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. p.83, 2012.

A malária é uma das prioridades da pesquisa mundial na área de desenvolvimento de vacinas. Apesar da contínua e crescente atividade de pesquisa nessa área, ainda não existe uma vacina capaz de impedir a infecção pelo *Plasmodium spp.* Devido ao complexo ciclo de vida deste agente, uma formulação vacinal eficaz para a indução de uma resposta imune protetora deverá conter uma combinação de regiões imunodominantes de antígenos do parasita. Portanto, este trabalho visou caracterizar a resposta imune humoral induzida pela imunização experimental de camundongos com o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1), região C-terminal da Proteína 1 da Superfície do Merozoíto e a Proteína 3 β da Superfície do Merozoíto de *P. vivax*, administradas isoladamente ou em combinação. As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade e por cromatografia de troca iônica, posteriormente foram analisadas por RP-HPLC confirmando o elevado nível de pureza das amostras. A imunogenicidade dessas formulações foi avaliada em duas linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6, e na presença de dois adjuvantes Quil A e Poly I:C. Os títulos de anticorpos IgG foram determinados por ELISA. Os camundongos C57BL/6 imunizados com a combinação dos antígenos, emulsificados em Quil A ou Poly I:C apresentaram altos títulos de anticorpos ($\log_{10}>4$), assim como os camundongos imunizados com os antígenos administrados individualmente. Em contraste, os camundongos BALB/c imunizados com a combinação dos antígenos apresentaram títulos de anticorpos mais baixos contra a proteína MSP1₁₉ ou contra as proteínas MSP1₁₉ e AMA-1 quando administradas na presença dos adjuvantes Quil A e Poly I:C, respectivamente. Interessantemente, observamos um aumento significativo nos títulos de anticorpos dos camundongos C57BL/6 imunizados com a combinação dos antígenos emulsificados em Poly I:C contra a proteína MSP3 β . A razão entre as subclasses de IgG mostraram um perfil de resposta mista Th1/Th2, em todos os grupos testados. Os anticorpos específicos mantiveram-se elevados por 6 meses após a última imunização, mostrando que a resposta imune induzida pelas imunizações

experimentais foi duradoura. Nossos dados, em conjunto, demonstram que a combinação de antígenos pode ser uma estratégia promissora de vacinação contra a malária.

Palavras-chaves: *Plasmodium vivax*. Vacina recombinante. Combinação de antígenos.

ABSTRACT

PEREIRA, M.O Analysis of the immune response induced by experimental immunization with recombinant antigens of *Plasmodium vivax*. Master thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. p.83, 2012.

Malaria is one of the priorities of global research in the area of vaccine development. In spite of the continuing and growing research activity in this area, there is still no vaccine to prevent infection by *Plasmodium* spp. Due to the complex life cycle of this agent, an effective vaccine formulation to elicit protective immune responses should contain a combination of immunodominant regions of parasite antigens. Therefore, this study aimed at characterizing the humoral immune response induced by experimental immunization of mice with Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1), C-terminal region of the Merozoite Surface Protein 1 and Merozoite Surface Protein 3 β of *P. vivax*, provided either alone or as a combination. The recombinant proteins were purified by affinity and ion exchange chromatography, subsequently were analyzed by RP-HPLC to confirm the high purity of the samples. The immunogenicity of these formulations was evaluated in BALB/c and C57BL/6 mice, administered in the presence of two different adjuvants, Quil A or Poly I:C. The humoral immune response was measured by IgG antibody titers using ELISA. C57BL/6 mice immunized with the recombinant antigen combination in the presence of Quil A or Poly I:C adjuvants showed high antibody titers ($\log_{10}>4$) similar to mice inject with a single antigen alone. In contrast, BALB/c mice immunized with the recombinant antigen combination had lower antibody titers to MSP1₁₉ or to MSP1₁₉ and AMA-1 when administered in the presence of Quil A or Poly I:C adjuvants, respectively. Interestingly, we observed a significant increased in the antibody titers of the C57BL/6 mice receiving the combination of antigens against MSP3 β protein in Poly I:C. The ratio between the IgG subclasses profile showed a mixed Th1/Th2 response in all groups tested. Specific antibodies were still high six months after the last immunizing dose indicating a long lived immune response. Together, our data show that the combination of antigens may be an effective strategy for immunization against malaria.

Key-words: *Plasmodium vivax*. Recombinant vaccine. Combination of antigens.

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo do <i>Plasmodium ssp</i>	6
Figura 2 - Representação esquemática das diferentes estratégias de vacinação contra a malária.....	11
Figura 3 - Análise da expressão e purificação da proteína recombinante MSP1 ₁₉ e MSP1 ₁₉ -PADRE produzida em <i>E. coli</i>	36
Figura 4 - Análise da expressão e purificação da proteína recombinante MSP3β produzida em <i>E. coli</i>	37
Figura 5 - Análise da expressão e purificação da proteína recombinante AMA-1 produzida em <i>Pichia pastoris</i>	39
Figura 6 – Análise comparativa dos títulos de anticorpos IgG de camundongos BALB/c após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1 ₁₉ e MSP3β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Quil A.....	40
Figura 7 – Avaliação do perfil de anticorpos IgG1 e IgG2a de camundongos BALB/c após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1 ₁₉ e MSP3β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Quil A.....	41
Figura 8 - Longevidade da resposta de anticorpos IgG de camundongos BALB/c após a imunização com as proteínas AMA-1, MSP1 ₁₉ e MSP3β administradas isoladamente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Quil A.....	42
Figura 9 – Análise comparativa dos títulos de anticorpos IgG de camundongos C57BL/6 após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1 ₁₉ , MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Quil A.....	43
Figura 10 – Avaliação do perfil de anticorpos IgG1 e IgG2c de camundongos C57BL/6 após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1 ₁₉ , MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Quil A.....	44
Figura 11 – Longevidade da resposta de anticorpos IgG de camundongos C57BL/6 após a imunização com as proteínas AMA-1, MSP1 ₁₉ , MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3β administradas isoladamente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Quil A.....	45
Figura 12 – Análise comparativa dos títulos de anticorpos IgG de camundongos BALB/c após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença	

do adjuvante Poly I:C.....	47
Figura 13 – Avaliação do perfil de anticorpos IgG1 e IgG2a de camundongos BALB/c após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Poly I:C.....	48
Figura 14 – Longevidade da resposta de anticorpos IgG de camundongos BALB/c após a imunização com as proteínas AMA-1, MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3β administradas isoladamente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Poly I:C.....	49
Figura 15 - Análise comparativa dos títulos de anticorpos IgG de camundongos C57BL/6 após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Poly I:C.....	50
Figura 16 – Avaliação do perfil de anticorpos IgG1 e IgG2c de camundongos C57BL/6 após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Poly I:C.....	51
Figura 17 – Longevidade da resposta de anticorpos IgG de camundongos C57BL/6 após a imunização com as proteínas AMA-1, MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3β administradas isoladamente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Poly I:C.....	52

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Candidatos à vacina contra o <i>Plasmodium vivax</i> que estão atualmente em desenvolvimento.....	12
Tabela 2 - Sumário das imunizações experimentais com a proteína MSP1 ₁₉	15
Tabela 3 - Sumário das imunizações experimentais com a proteína AMA-1.....	21
Tabela 4 - Sumário das proteínas recombinantes expressas.	27
Tabela 5 - Esquema de imunização dos camundongos BALB/c com cada uma das proteínas individualmente ou em combinação.....	31
Tabela 6 - Esquema de imunização dos camundongos C57BL/6 com cada uma das proteínas individualmente ou em combinação.....	31

Lista de Abreviaturas

ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
Alum	Hidróxido de Alumínio – sais minerais baseados em alumínio
aa	Aminoácidos
ADP	Adenosina difosfato
AMA-1	Antígeno 1 de Membrana Apical
BMGY	<i>Buffered Glycerol Complex Medium</i>
BMMY	<i>Buffered Methanol Complex Medium</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
NK	Natural Killer
DBP	Proteína ligante de Duffy
EBA	Antígeno ligante de eritrócito
ELISA	Ensaio imunoenzimático
g	Grama
GLURP	Proteína rica em glutamato
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropyl- β -D thiogalactopyranoside
kDa	Quilo Dalton
L	Litro
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPLA	Monofosforil Lipídeo A
MSP	Proteína de Superfície do Merozoíto
DO	Densidade óptica

OPD	σ -Phenylenediamine
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PvRII	Região II da Proteína Ligante de Duffy
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
RNA	Ácido ribonucléico
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SEM	Erro Padrão da Média
SUB	<i>Protease subtilisin</i>
Temed	N,N,N',N' tetrametil etilenodiamida
TFA	Ácido trifluoroacético
TLR	Receptor do tipo Toll
YNB	Nitrogênio Levedura Base
μg	Micrograma
μm	Micrometros

Sumário

Resumo	viii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas	xiv
I. Introdução.....	1
1. Histórico e Aspectos Epidemiológicos.....	2
2. Agente Etiológico e Ciclo Evolutivo.....	4
3. Particularidades da biologia do <i>Plasmodium vivax</i>	7
4. Importância do desenvolvimento de vacinas contra a malária.....	7
4.1 Vacinas contra o estágio pré-eritrocítico.....	8
4.2 Vacinas contra o estágio sanguíneo	9
4.3 Vacinas contra o estágio sexuado do parasito	10
5. Antígenos Alvos.....	13
5.1 Proteína 1 da Superfície do Merozoíto (MSP-1).....	13
5.2 Proteína 3 da Superfície do Merozoíto (MSP-3)	17
5.3 Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1).....	19
II.Objetivos.....	24
1. Objetivo Geral.....	25
2. Objetivos Específicos.....	25
III. Material e Métodos.....	26
1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	27
1.1 MSP1 ₁₉ , MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3 β	27
1.2 AMA-1.....	29
2. Análise das proteínas recombinantes por cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa.....	30
3. Imunizações experimentais.....	30

4. Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	32
5. Análise estatística	33
IV. Resultados.....	34
1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	35
2. Análise comparativa da resposta imune humoral induzida após imunização com as proteínas recombinantes administradas isoladamente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Quil A.....	39
2.1 Resposta imune humoral gerada em camundongos BALB/c.....	39
2.2 Resposta imune humoral gerada em camundongos C57BL/6.....	43
3. Análise comparativa da resposta imune humoral induzida após imunização com as proteínas recombinantes administradas isoladamente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Poly I:C.....	46
3.1 Resposta imune humoral gerada em camundongos BALB/c.....	46
3.2 Resposta imune humoral gerada em camundongos C57BL/6.....	49
V. Discussão.....	53
VI. Conclusões.....	62
VII. Referências Bibliográficas.....	64
VIII. Anexos.....	77

I. Introdução

1. Histórico e Aspectos Epidemiológicos

A malária, também conhecida como paludismo, febre palustre, impaludismo, maleita ou sezão (Ministério da saúde - Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária, 2009) é uma doença muito antiga existindo relatos, em documentos chineses, que datam de 2700 a.C. e textos Hindus do século VI a.C. (revisto por COX, 2010).

Inicialmente se imaginava que a febre malárica era causada por miasmas do pântano, daí o termo malária, originado do italiano, 'mal'aria' significando ar ruim (revisto por TUTEJA, 2007). Somente após 1878 – 1879 com a elucidação da teoria dos germes por Louis Pasteur e Robert Koch, demonstrando que os microorganismos eram responsáveis por causarem as doenças infecciosas, que foram intensificadas as pesquisas para a descoberta do agente infeccioso da malária (revisto por COX, 2010).

Em 1880, o médico francês Charles Louis Alphonse Laveran, descobriu o agente que causa a malária no sangue de pacientes infectados. Com essa descoberta Laveran ganhou o prêmio Nobel de medicina em 1907. Em 1898 foi descoberto, por malariologistas italianos, que a transmissão dessa patologia ocorre através da picada de insetos do gênero *Anopheles*. A partir desses achados, o complexo ciclo de vida do *Plasmodium* pôde ser então elucidado, com a união de inúmeros estudos que foram conduzidos utilizando-se modelos não humanos, como pássaros e primata (revisto por COX, 2010).

Atualmente, a malária continua sendo um grave problema de saúde pública em todo o mundo, sendo endêmica em 106 países e territórios. Apenas no ano de 2010 foram relatados 216 milhões de casos e 655 mil mortes, sendo que 91% das mortes ocorreram em regiões da África. Outro dado importante, é que cerca de 86% das mortes a nível mundial foram em crianças menores de 5 anos de idade (*World Malaria Report* - WHO, 2011).

A distribuição geográfica da endemia causada pelo *Plasmodium vivax* se sobrepõe a causada pelo *Plasmodium falciparum*, exceto em zonas temperadas, como a península coreana, onde somente malária *vivax* ocorre, e em grande parte da África Subsariana onde a população é Duffy negativo o que parece excluir ou

limitar a endemia causada pelo *P. vivax*. Em países latino americanos mais de 80% dos casos de infecção reportados são causados por *P. vivax* e, em regiões da Índia e China também há predominância dessa espécie (revisto por MUELLER et al., 2009). O *P. vivax* é a espécie de maior distribuição geográfica (*Center for Disease Control and Prevention* – CDC, 2006), gerando cerca de 80 – 300 milhões de infecções por ano (revisto por HERRERA; CHITNIS; HERRERA, 2010).

Nas Américas, em 2010, a transmissão da malária ocorreu em 21 países, e cerca de 30% dessa população está sob o risco de contrair a infecção. Sendo que, 70% de todos os casos relatados foram gerados pelo *P. vivax*, apenas no Haiti e na República Dominicana a totalidade dos casos reportados foram gerados pelo *P. falciparum* (*World Malaria Report* - WHO, 2011). Vale ressaltar que aproximadamente 60% do total de casos reportados nas Américas são provenientes do Brasil (QUINTERO et al., 2011).

No Brasil, 99,8% dos casos ocorrem na região da Bacia Amazônica. Essa transmissão é gerada por três espécies de *Plasmodium*: *P. vivax*, *P. falciparum* e *Plasmodium malariae*, sendo que 83,7% dos casos notificados são gerados pelo *P. vivax*, 16,3% pelo *P. falciparum* e apenas uma pequena parcela dos casos ocorrem pelo *P. malariae* (revisto por OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Na região Amazônica, o número total notificações foi de 217.298 no ano de 2011, o que representa uma redução de 23% quando comparado ao mesmo período de 2010 (Ministério da Saúde, 2012).

Até pouco tempo a malária *vivax* era erroneamente classificada como sendo uma doença benigna (QUINTERO et al., 2011). No entanto, no Brasil, desde 1990, são reportados casos clínicos graves e até mesmo mortes associados à infecção pelo *P. vivax*. Pesquisadores da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, no ano de 2000, relataram um aumento da gravidade clínica da doença, resultando em um número de hospitalizações semelhantes às reportadas pelo *P. falciparum*. As principais manifestações clínicas que culminaram nessas hospitalizações foram icterícia e anemia grave (ALEXANDRE et al., 2010).

2. Agente Etiológico e Ciclo Evolutivo

Os parasitos causadores da malária são protozoários do gênero *Plasmodium*, pertencem à família Plasmodiidae e ao filo Apicomplexa (REY, 2008).

São conhecidas 156 espécies de parasitos que causam malária em hospedeiros vertebrados (CDC, 2009). Há quatro espécies que tipicamente infectam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *Plasmodium ovale* (WHO, 2008). Porém existem evidências de que o *Plasmodium knowlesi* é a quinta espécie que causa malária humana, apesar de sua preferência por infectar macacos (WHITE, 2008).

O ciclo evolutivo dos plasmódios humanos inicia-se com a inoculação de esporozoítos na derme do hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo da fêmea do inseto *Anopheles*. Foi verificado, em modelos murinos de infecção, utilizando-se o *Plasmodium berghei*, que mais da metade dos esporozoítos inoculados permanecem na derme por pelo menos 1 hora e cerca de 40% por mais de 6 horas, após a picada do mosquito. Dos esporozoítos que deixam o local de inoculação, aproximadamente 70% atingem a corrente sanguínea e o restante a circulação linfática onde são drenados para os linfonodos mais próximos e então, em poucas horas, são eliminados (GUEIRARD et al., 2010). Na corrente sanguínea, os esporozoítos atingem o fígado e invadem os hepatócitos, onde ocorre sua multiplicação e diferenciação em milhares de merozoítos que são os responsáveis por invadir os eritrócitos. Essa primeira fase precede a fase sanguínea de desenvolvimento do parasito e, portanto é chamada de fase pré-eritrocítica ou exo-eritrocítica (revisto por GOOD; DOOLAN, 2010).

O tempo para o completo desenvolvimento dos parasitos nas células hepáticas varia para cada espécie de *Plasmodium*, variando de 8-25 dias para o *P. falciparum*, 8-27 dias para o *P. vivax*, 9-17 dias para o *P. ovale* e de 15-30 dias para o *P. malariae*, sendo que este intervalo é denominado de período pré-patente. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* podem ser encontrados estágios dormentes do parasito no fígado, os hipnozoítos, os quais podem permanecer no organismo do hospedeiro por anos, antes de iniciarem um novo ciclo de reprodução assexuada, sendo responsáveis pela recaída da doença (revisto por TUTEJA, 2007). Sendo que,

os hipnozoítos tornam a erradicação da malária mais difícil de ser alcançada (HULDEN; HULDEN, 2011).

O ciclo eritrocítico da doença inicia-se quando os merozoítos que foram liberados do fígado invadem os eritrócitos. Os merozoítos de *P. falciparum* invadem eritrócitos de todas as idades, já os do *P. vivax* invadem preferencialmente os reticulócitos. Essa interação dos merozoítos com os eritrócitos/reticulócitos envolve o reconhecimento de receptores específicos (revisto por COWMAN; CRABB, 2006; GAUR et al., 2004). Dentro do eritrócito os merozoítos também se reproduzem através da esquizogonia, gerando assim novos merozoítos que invadirão outros eritrócitos, após sucessivas gerações de merozoítos sanguíneos ocorre à diferenciação em gametócitos, estágio sexuado do parasito, este terá seu ciclo continuado apenas no inseto vetor, dando origem aos esporozoítos (revisto por TUTEJA, 2007).

O ciclo eritrocítico e a conseqüente destruição dos eritrócitos e liberação de seus metabólitos estimulam a produção do fator de necrose tumoral e outras citocinas que são os responsáveis pelas manifestações clínicas e pela patologia da malária, este ciclo se repete sucessivas vezes, a cada 72 horas nas infecções pelo *P. malariae* e a cada 48 horas nas infecções pelo *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*. Os sintomas da malária podem se desenvolver rapidamente, cerca de 6-8 dias, após a picada ou mesmo depois de meses que o paciente saiu de uma área endêmica. Em geral, o paciente é acometido por febre, calafrios, tosse, dificuldade respiratória, dor nas articulações, dor de cabeça, diarreia aquosa, vômitos e convulsões. Porém em alguns casos o paciente pode apresentar icterícia, insuficiência renal e anemia grave caracterizando a malária grave (revisto por TUTEJA, 2007).

Apesar da infecção pelo *P. vivax* ser considerada menos grave do que a infecção pelo *P. falciparum*, ela pode causar repetidas recidivas e complicações fatais, incluindo a malária cerebral, insuficiência renal aguda, colapso circulatório, anemia severa, insuficiência respiratória aguda, dentre outras manifestações (revisto por MUELLER et al., 2009).

Em geral toda pessoa é susceptível a infecção por malária, porém algumas pessoas ficam mais expostas ao parasito. Pessoas que tiveram muitos episódios de malária podem atingir um quadro de imunidade parcial apresentando um quadro

assintomático ou subclínico (Ministério da Saúde – Guia de vigilância epidemiológica, 2009).

Quando a fêmea do mosquito *Anopheles* realiza o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado pelo *Plasmodium*, ela ingere os gametócitos do parasito e em seu intestino ocorre a gametogênese, ou seja, os gametócitos originam os gametas extracelulares, o gametócito feminino origina o macrogameta e o masculino origina microgametas, iniciando-se assim o ciclo sexuado do parasito. Um microgameta fecunda um macrogameta, dando origem ao zigoto que origina o oocineto. Este, por sua vez, atravessa a parede do intestino médio do inseto onde se encista, dando origem ao oocisto que inicia um processo de divisão esporogônica. Após alguns dias a parede do oocisto rompe-se liberando assim os esporozoítos formados, que irão atingir a glândula salivar do mosquito, tornando-o infectante. Os esporozoítos podem ser encontrados na glândula salivar do mosquito depois de 10-18 dias, tornando-o infectante por 1 a 2 meses. Os esporozoítos serão injetados no hospedeiro vertebrado junto com a saliva, durante um novo repasto sanguíneo, desse mosquito (revisto por TUTEJA, 2007).

A Figura 1 apresenta uma representação esquemática do ciclo evolutivo do *Plasmodium*.

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo do *Plasmodium* ssp. Adaptado do site http://www.mcwhhealthcare.com/malaria_drugs_medicines/life_cycle_of_plasmodium.htm (acesso em 13 de dezembro de 2011)

3. Particularidades da biologia do *Plasmodium vivax*

Existem várias particularidades na biologia do *P. vivax* que exigem abordagens distintas para o seu controle assim como para o desenvolvimento e testes de novos candidatos a vacinas. Na infecção pelo *P. vivax* os gametócitos são gerados muito mais cedo e com densidades parasitárias mais baixas o que aumenta a transmissão da infecção aos mosquitos vetores. Além disso, o ciclo no mosquito completa-se muito mais rápido e em temperaturas mais baixas, quando comparado ao *P. falciparum*, portanto sua transmissão ocorre em uma ampla gama de condições climáticas (revisto por MUELLER et al., 2009).

Outra particularidade da infecção pelo *P. vivax* são as recaídas decorrentes dos hipnozoítos, o que permite que com uma única picada do mosquito desenvolvam-se novos ciclos sanguíneos da doença, possibilitando assim a persistência do parasito no hospedeiro humano mesmo em períodos de reprodução do mosquito, onde a transmissão seria mais baixa. Esses aspectos permitem que a transmissão do *P. vivax* ocorra eficientemente mesmo em áreas onde a população de mosquitos seja altamente sazonal, dificultando assim a eliminação da doença através do controle do mosquito vetor (revisto por MUELLER et al., 2009).

Medidas inovadoras de controle, visando especificamente às particularidades do *P. vivax*, o desenvolvimento de novas drogas para o combate aos hipnozoítos, assim como o desenvolvimento de uma vacina contra essa espécie se faz necessário para um efetivo controle da malária (revisto por MUELLER et al., 2009).

4. Importância do desenvolvimento de vacinas contra a malária

Algumas estratégias como medicamentos e uso de inseticidas são utilizadas como controle da malária, porém a ineficácia dos inseticidas como controle dos vetores e resistência dos parasitos a drogas antimaláricas requerem o desenvolvimento de uma vacina como medida preventiva (revisto por HERRERA et

al., 2007). O desenvolvimento de uma vacina segura, eficaz e acessível é uma prioridade de saúde pública global (POLHEMUS, 2009).

Diversos fatores sustentam o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a malária, dentre eles podemos destacar um estudo feito em 1967, onde foi visto que a imunização de camundongos com esporozoítos irradiados foi capaz de gerar proteção contra o desafio com o *Plasmodium berghei* (RAPPUOLI; ADEREM, 2011). Outro importante estudo, que foi conduzido entre os anos de 1989-1999, mostrou que humanos imunizados com picadas de mosquitos irradiados carregando esporozoítos de *P. falciparum* foram protegidos durante o desafio feito 9 semanas após a última imunização (HOFFMAN et al., 2002).

Vale ressaltar que indivíduos que moram nas áreas endêmicas, após sucessivas infecções desenvolvem uma sintomatologia mais branda. Essa proteção é gerada pela produção de anticorpos que possuem várias funções, dentre elas, inibição da invasão dos eritrócitos pelo parasito, bloqueio do parasito que está dentro do eritrócito, mediação da inibição das células mononucleares, neutralização dos efeitos tóxicos gerados pela ruptura dos eritrócitos que culminariam na sintomatologia da doença (revisto por HERRERA et al., 2007).

O complexo ciclo de vida do parasito, com muitos estágios, e o fato da resposta do sistema imunológico direcionada a uma dessas fases, muitas vezes não afetar o próximo estágio do parasito, torna o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a malária muito mais difícil do que contra vírus ou bactérias. Justificando assim a necessidade do desenvolvimento de uma vacina que contenha vários antígenos de uma única fase ou uma combinação de antígenos de diferentes fases do parasito (revisto por MILLER; HOFFMAN, 1998).

Atualmente, existem tentativas de desenvolvimento de vacinas para cada uma das etapas do complexo ciclo de vida do parasito:

4.1 Vacinas contra o estágio pré-eritrocítico

Possuem o objetivo de bloquear a doença impedindo a invasão dos esporozoítos no fígado (revisto por MILLER; HOFFMAN, 1998). São exemplos dessa

estratégia, as vacinas que utilizam os esporozoítos irradiados ou atenuados geneticamente (revisto por GREENWOOD; TARGETT, 2011).

Destaca-se a vacina RTS,S que utiliza a proteína dominante na superfície do esporozoíto, denominada Proteína Circumsporoíto (CSP) de *P. falciparum*, ligada ao antígeno de superfície da hepatite B. Essa vacina começou a ser estudada em 1980 e atualmente encontra-se em teste clínico de fase 3, envolvendo cerca de 15.000 crianças, em 7 países da África (revisto por GREENWOOD; TARGETT, 2011). Resultados preliminares obtidos a partir de 6.000 crianças, mostram que após 3 doses da vacina e 12 meses de acompanhamento, houve uma redução da incidência da malária clínica em 55,8% e uma redução nos casos severos de malária em 47,3%. Esses resultados mostram-se muito promissores e, portanto a RTS,S será provavelmente a primeira vacina contra malária licenciada, tornando-se disponível até 2015 (RTS,S *Clinical Trials Partnership*, 2011).

No entanto, essa estratégia de vacinação previne o desenvolvimento de uma resposta contra os estágios sanguíneos da doença o que pode acarretar em um aumento do número de casos severos e até mesmo de mortes se a resposta imunológica gerada contra o estágio pré-eritrocítico diminuir com o passar do tempo. Portanto, a vacina ideal deverá combinar antígenos tanto do estágio pré-eritrocítico como do estágio sanguíneo (revisto por MILLER; HOFFMAN, 1998).

4.2 Vacinas contra o estágio sanguíneo

O objetivo dessas vacinas é impedir a invasão dos merozoítos aos eritrócitos ou inibir a sua conseqüente multiplicação (revisto por GREENWOOD; TARGETT, 2011). A sintomatologia da doença é gerada durante o seu estágio sanguíneo, quanto maior a parasitemia maior é a gravidade dos sintomas do paciente. Portanto, o foco principal dessa estratégia é prevenir o desenvolvimento dos graves sintomas associados à doença. Essa estratégia de vacinação visa impedir o desenvolvimento da doença e não a infecção (revisto por MILLER; HOFFMAN, 1998).

Estudos demonstram que anticorpos gerados durante a infecção natural, contra as proteínas presentes na superfície dos merozoítos ou contra antígenos expressos na superfície do eritrócito são capazes de promover aglutinação ou promover a

inibição do crescimento do parasito *in vitro*, sustentando assim a utilização desses antígenos em uma estratégia de vacinação (revisto por GOOD; DOOLAN, 2010).

Um grande número de vacinas baseadas nos estágios sanguíneos de *P. falciparum* já foram desenvolvidas e testadas em ensaios pré-clínicos e clínicos. Essas vacinas foram baseadas nos antígenos presentes na superfície do merozoito, dentre eles, a Proteína 1 de Superfície do Merozoito (MSP-1), o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1), o Antígeno Ligante do Eritrócito 175 (EBA-175) e a Proteína 3 de Superfície do Merozoito (MSP-3) (revisto por GREENWOOD; TARGETT, 2011).

4.3 Vacinas contra o estágio sexuado do parasito

Essas vacinas visam impedir que os mosquitos se tornem infectantes, bloqueando a fecundação dos gametas do parasito e/ou impedindo o seu desenvolvimento no inseto vetor (revisto por GREENWOOD; TARGETT, 2011). São chamadas vacinas bloqueadoras da transmissão, sendo que os anticorpos ingeridos junto com os gametócitos, durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, é que vão desempenhar essa função (revisto por MILLER; HOFFMAN, 1998). Uma importante vantagem desse tipo de vacina é que elas vão agir sob o parasito no seu estágio mais vulnerável, ou seja, quando ele está sendo transferido de um hospedeiro para outro, estando assim em uma menor quantidade (revisto por GREENWOOD; TARGETT, 2011).

São utilizados como alvos para essa estratégia de vacinação os antígenos presentes na superfície dos gametas, P230, P48/45 e HAP2, prevenindo assim a fertilização no intestino médio dos mosquitos e também os antígenos presentes no oocineto, P25 e P28, prevenindo assim a migração do oocineto através da parede do intestino do mosquito (revisto por GREENWOOD; TARGETT, 2011). É considerada uma excelente alternativa para bloquear a transmissão de parasitos que já se tornaram resistentes às drogas comumente utilizadas na terapêutica da malária. Sendo que o foco de sua utilização será em áreas onde a transmissão é baixa ou instável prevenindo assim epidemias nessas comunidades (revisto por MILLER; HOFFMAN, 1998).

A figura abaixo resume as diferentes estratégias de vacinação anteriormente citadas.

Figura 2 - Representação esquemática das diferentes estratégias de vacinação contra a malária. Adaptado do site <http://www.malariavaccine.org/malvac-lifecycle.php> (acesso em 09 de dezembro de 2011).

Durante décadas houve um grande foco no desenvolvimento de uma vacina contra o *P. falciparum*. Atualmente mais de 70 formulações vacinais compostas por diferentes antígenos dessa espécie estão em desenvolvimento e 23 estão em testes clínicos. Pouco foi investido no desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax*, pois além das dificuldades técnicas existentes, como a ausência do cultivo do parasito *in vitro*, o que facilitaria a triagem de antígenos alvos, existia a idéia de que o *P. vivax* causaria apenas uma doença benigna, o que atualmente já foi desmistificado. Atualmente, existem apenas dois antígenos de *P. vivax* que estão em testes clínicos de fase I. Porém, para que se cumpra o objetivo proposto de erradicar a malária no mundo, novos esforços devem ser feitos para o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax* (revisto por ARRÉVALO-HERRERA; CHITNIS; HERRERA, 2010).

A tabela abaixo mostra os principais candidatos vacinais contra o *P. vivax* que estão atualmente em desenvolvimento

Tabela 1 – Candidatos à vacina contra o *P. vivax* que estão atualmente em desenvolvimento (Tabela adaptada da revisão ARRÉVALO-HERRERA; CHITNIS; HERRERA, 2010).

Estágio do Parasito	Antígeno	Tipo	Testes Pré-clínicos		Testes Clínicos – Fase I
			Roedor	Primatas	
Pré-eritrocítico	CSP-N	LSP	+	+	+
	CSP-R	LSP	+	+	+
	CSP-C	LSP	+	+	+
	SSP2/TRAP	LSP	-	-	-
Estágio sanguíneo assexuado	MSP-1(42-19)	Rec	+	+	-
	MSP-1 (200L)	Rec	+	+	-
	MSP-9	Rec	+	-	-
	DBP-RII	Rec	+	+	-
	AMA-1	Rec	+	+	-
Estágio sanguíneo sexuado	Pvs25	Rec	-	+	+
	Pvs28	Rec	-	+	-
Mistura	CSP, SSP2, AMA-1, MSP-1	DNA	-	+	-

Abreviações: CSP-N – região N-terminal da proteína circumsporozoíto; CSP-R – domínio central repetitivo da proteína circumsporozoíto; CSP-C – região C-terminal da proteína circumsporozoíto; SSP2/TRAP – proteína 2 da superfície do esporozoíto/ proteína adesiva de trombospodina; MSP – proteína de superfície de merozoíto; DBP – proteína ligante de Duffy; AMA-1 – antígeno 1 de membrana apical; LSP – peptídeo sintético longo. Rec – proteína recombinante.

5. Antígenos-alvos

5.1 Proteína 1 da Superfície do Merozoíto (MSP-1).

A MSP-1 é considerada uma promissora candidata a compor uma vacina contra a fase sanguínea assexuada do parasito, sendo uma das moléculas presentes na superfície do merozoíto mais estudadas (revisto por HOLDER, 2009).

A MSP-1 é uma glicoproteína sintetizada durante o desenvolvimento do esquizonte como um grande precursor, com aproximadamente 200 kDa, ficando ligada à superfície do merozoíto através de uma âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI). Durante a liberação dos merozoítos a MSP1 é clivada pela ação de uma protease conhecida como SUB1 (protease subtilisin 1), gerando com isso quatro fragmentos que continuam unidos através de ligações não covalentes. Esses fragmentos foram nomeados pelo seu aparente peso molecular, sendo eles: fragmento N-terminal de 83 kDa (MSP1₈₃); fragmentos internos de 30 e 38 kDa (MSP1₃₀ e MSP1₃₈); e fragmento C-terminal de 42 kDa (MSP1₄₂) (revisto por HOLDER, 2009).

No momento em que o parasito invade as células vermelhas do sangue entra em ação outra protease, a SUB2 (protease subtilisin 2), que cliva o fragmento C-terminal de 42 kDa em duas outras frações: fragmento N-terminal de 33 kDa (MSP1₃₃) e fragmento C-terminal de 19 kDa (MSP1₁₉). Após essa segunda clivagem o fragmento de 33 kDa é liberado da superfície do merozoíto juntamente com o resto do complexo da MSP-1, restando apenas a MSP1₁₉ ligada à superfície do parasito através da âncora de GPI (revisto por HOLDER, 2009).

A sequência de nucleotídeos e dos prováveis aminoácidos da MSP-1 de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. yoelii* foram comparadas entre si, e foi visto que esta proteína possui 10 regiões com alta similaridade de aminoácidos, entre essas espécies, dentre elas a região C-terminal da proteína (DEL PORTILLO et al., 1991). A sequência da MSP1₁₉ de *P. vivax* de 20 isolados do Sudeste da Ásia foi comparada entre si e foi observado a substituição de apenas 1 aminoácido dentre essas diferentes cepas (PASAY et al., 1995). Um estudo conduzido pelo nosso grupo, analisando a sequência de 28 isolados, mostrou que essa substituição não foi encontrada nas amostras brasileiras, esse estudo também revelou que essa alteração não é imunologicamente relevante, uma vez que anticorpos policlonais de

coelhos, anticorpos monoclonais de camundongos e anticorpos de pacientes infectados pelo *P. vivax* foram capazes de reconhecer os dois diferentes alelos anteriormente reportados (SOARES et al., 1999).

Anticorpos monoclonais contra a MSP1₁₉ são capazes de inibir a invasão dos eritrócitos *in vitro*. O mecanismo exato pelo qual isso ocorre ainda é desconhecido, mas pode estar relacionado com a inibição do processamento secundário da MSP-1, bloqueio da interação dessa proteína com receptores da superfície dos eritrócitos e aglutinação dos merozoítos logo após a ruptura dos esquizontes, impedindo a propagação dos mesmos e consequentemente a invasão de novos eritrócitos (revisto por HOLDER, 2009). O potencial desta molécula para o desenvolvimento de uma vacina tem motivado diversos estudos que avaliam as propriedades imunogênicas de proteínas recombinantes contendo a MSP1₁₉, em modelos experimentais.

Estudos imunoepidemiológicos conduzidos com a proteína recombinante baseada na MSP1₁₉ de *P. vivax*, mostraram que essa proteína é altamente imunogênica, sendo reconhecida por anticorpos e células T da maioria dos indivíduos brasileiros recentemente expostos ou infectados pelo *P. vivax* (SOARES et al., 1997; SOARES et al., 1999). Além disso, uma proteína recombinante bacteriana expressa no vetor pET (His₆-MSP1₁₉) reteve os epítomos nativos, sendo reconhecida por anticorpos de 93,5% de indivíduos brasileiros expostos à malária por *P. vivax* (RODRIGUES et al., 2003). A adição de um epítomo sintético universal denominado Pan Allelic DR Epitope (PADRE) (CUNHA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2003) e de um epítomo de 33-kDa presente na região C-terminal da MSP-1 de *P. vivax* (DYDVVVYLKPLAGMYK) (ROSA et al., 2006), ambos de célula T, não modificaram o reconhecimento da MSP1₁₉ por IgG humana naturalmente adquirida.

Novas formulações de vacinas recombinantes para malária baseadas no fragmento C-terminal de 19-kDa têm sido testadas. Cunha e colaboradores (2001) verificou que após apenas duas imunizações utilizando os adjuvantes TiterMax, MPL/TDM/CWS ou Alum com CpG ODN 1826 foi gerado altos títulos de anticorpos, como os que são obtidos quando se utiliza o adjuvante completo de Freund (ACF).

Uma estratégia desenvolvida, pelo nosso grupo, com o intuito de potencializar a resposta imunológica, foi administrar a MSP1₁₉ com o agonista do receptor *Toll-like* (TLR-5), a flagelina FlhC de *Salmonella* Typhimurium, sendo que a proteína foi

administrada emulsificada com a FliC ou geneticamente ligada a ela. Foi visto que ambas as formulações promovem uma forte e duradoura resposta imune nos camundongos vacinados (BARGIERI et al., 2008).

Diversos estudos para verificar a imunogenicidade da MSP1₁₉, das diferentes espécies de *Plasmodium*, vêm sendo conduzidos. A tabela 2 mostra um resumo dos principais ensaios de imunizações experimentais feitas com essa proteína.

Tabela 2 – Sumário das imunizações experimentais com a proteína MSP1₁₉.

Espécie	Modelo	Tipo de antígeno	Resultado	Referência
<i>P. yoelii</i>	Camundongo	Proteína recombinante: região C-terminal (19kDa)	Proteção contra a infecção	DALY et al. (1993)
<i>P. yoelii</i>	Camundongo	Proteína recombinante: região C-terminal (19kDa)	Proteção contra a infecção	LING et al. (1994)
<i>P. yoelii</i>	Camundongo	Proteína recombinante: região C-terminal (19kDa)	Proteção contra a infecção	HIRUNPETCHA RAT et al. (1998)
<i>P. yoelii</i>	Camundongo	Proteína recombinante: região C-terminal (19kDa)	Proteção contra a infecção	HIRUNPETCHA RAT et al. (1999)
<i>P. yoelii</i>	Camundongo	Proteína recombinante: região C-terminal (19kDa)	Resposta de anticorpos duradoura e proteção contra a infecção	JEAMWATTAN ALERT et al. (2007)
<i>P. yoelii</i>	Camundongo	Proteína recombinante: região C-terminal (19kDa)	Proteção contra a infecção	HIRUNPETCHA RAT et al. (2011)
<i>P. falciparum</i>	Macaco	Proteína recombinante: MSP1 ₁₉ + domínio III da AMA-1	Altamente imunogênica e segura	LANGERMANS et al. (2006)
<i>P. falciparum</i>	Camundongo	Proteína recombinante: região C-terminal (19kDa)	Anticorpos capazes de bloquear o crescimento do parasito in vitro	ZHANG et al. (2006)

Continuação: Tabela 2 – Sumário das imunizações experimentais com a proteína MSP1₁₉.

Espécie	Modelo	Tipo de antígeno	Resultado	Referência
<i>P. vivax</i>	Camundongo	Proteína recombinante: região C-terminal (19kDa) MSP1 ₁₉ , MSP1 ₁₉ -PADRE	Altos títulos de anticorpos	CUNHA et al. (2001)
<i>P. vivax</i>	Camundongo	Proteína recombinante: região C-terminal (19kDa) MSP1 ₁₉ , MSP1 ₁₉ -PADRE,	Altos títulos de anticorpos	ROSA et al. (2004)
<i>P. vivax</i>	Camundongo e Macaco	Proteína recombinante: região C-terminal (19kDa) MSP1 ₁₉ -PADRE MSP1 ₁₉ -DYDVVYLKPLAGM YK-PADRE.	Indução de resposta imune humoral e celular	ROSA et al. (2006)
<i>P. vivax</i>	Camundongo	Proteína recombinante: MSP1 ₁₉ co-administrada à PvRII (região II da Proteína ligante de Duffy)	Altos títulos de anticorpos	DEVI et al. (2007)
<i>P. vivax</i>	Camundongo	Proteína recombinante: região C-terminal (19kDa) MSP1 ₁₉ -PADRE, FLiC-MSP1 ₁₉ -PADRE, MSP1 ₁₉ -PADRE +FLiC, MSP1 ₁₉ + FLiC	Indução de resposta imune humoral e celular	BARGIERI et al. (2008)

5.2 Proteína 3 da Superfície do Merozoíto (MSP-3).

Com base na MSP-3 de *P. falciparum* foi construído um peptídeo sintético contendo regiões conservadas desta proteína e epítomos para estimulação de células B humanas. Esse peptídeo sintético foi testado em 36 voluntários, utilizando-se os adjuvantes Alum e Montanide ISA-720. A vacinação induziu a produção de anticorpos citofílicos que foram capazes de inibir o crescimento do parasito *in vitro* e *in vivo* utilizando-se camundongos humanizados (DRUILHE et al., 2005).

Esse mesmo grupo conduziu um estudo com crianças entre 12 e 24 meses de idade, as crianças receberam três doses da vacina composta por um peptídeo sintético longo baseado na *PMSP3* (MSP3-LSP) adsorvido em hidróxido de alumínio, o grupo controle recebeu a vacina para hepatite B. Foi visto uma redução na incidência do número de casos de malária no grupo que recebeu a imunização com a MSP3-LSP quando comparado com o grupo controle (DRUILHE et al., 2011).

A MSP-3 de *P. vivax* foi inicialmente descrita em 1999, esta proteína é expressa durante a esquizogonia e é encontrada na superfície de esquizontes maduros e dos merozoítos (GALINSKI et al, 1999). A MSP-3 de *P. vivax* possui homologia com a MSP-3 de *P. falciparum* (revisto por GALINSKI; BARNWELL, 2008). Esta proteína possui um domínio central rico em alanina que parece formar uma estrutura secundária em α -hélice e uma estrutura terciária *coil-coiled*. Essas proteínas não possuem uma região hidrofóbica que poderia ancorá-las na superfície do merozoito e, por isto, acredita-se que possa ocorrer uma associação delas com outras proteínas ancoradas na superfície (GALINSKI et al., 1999; GALINSKI et al., 2001).

O gene *PvmSP-3* possui múltiplas cópias diferentes, porém todas nitidamente relacionadas, formando assim uma família de genes codificadora de diferentes proteínas que possuem características estruturais e antigênicas únicas, fazem parte dessa família de proteínas a MSP3 α , MSP3 β e MSP3 γ (GALINSKI et. al., 2001). O projeto genoma revelou que a cepa Salvador I possui 11 cópias do gene *mSP-3*, todas com características comuns e localizadas no mesmo *locus*. Esses 11 genes codificam proteínas com as mesmas características estruturas, ou seja, as proteínas

possuem o domínio central rico em alanina, estrutura secundária em α -hélice e estrutura terciária *coil-coiled* (revisto por GALINSKI; BARNWELL, 2008).

É importante ressaltar que essa diferença encontrada nas seqüências de ácidos nucleicos dentro da família da *msp3* reflete-se no reconhecimento dos anticorpos aos epítomos dessas proteínas, pois foi verificado, por *immunoblotting*, que os anticorpos direcionados a MSP3 β não reconhecem a MSP3 α e o inverso também é verdadeiro, ou seja, os anticorpos direcionados à MSP3 α não reconheceram a MSP3 β (GALINSKI et al., 2001).

Proteínas recombinantes baseadas nas MSP-3 de *P. vivax* foram utilizadas em estudos imunoepidemiológicos, onde se pode comprovar que 68,2% dos indivíduos com infecção patente apresentaram anticorpos IgG contra a MSP3 α e 79,1% contra a MSP3 β , confirmando assim que as MSP-3 são imunogênicas em infecções naturais (JIMENEZ, 2007).

Há aproximadamente 15 anos, imunizações experimentais com duas proteínas da família da MSP-3 de *P. vivax* foram conduzidas em macacos *Saimiri boliviensis*. Foram utilizadas, nesse estudo, as proteínas MSP3 α e MSP3 β , expressas em *Escherichia coli* e emulsificadas em ACF. Altos títulos de anticorpos foram induzidos pelas imunizações experimentais (títulos $> 10^6$). Esses macacos foram infectados com a cepa Belém e uma modesta proteção pode ser observada, pois houve uma redução na parasitemia desses animais em 60-70%, além disso, foi observada uma atenuação no curso da infecção. Posteriormente, imunizações experimentais utilizando a proteína PvMSP3 α com o adjuvante Montanide ISA-720 foram conduzidos em macacos *Saimiri boliviensis*, nesse ensaio não foi observada proteção (revisto por GALINSKI; BARNWELL, 2008).

Recentemente, nosso grupo realizou imunizações experimentais, em camundongos BALB/c, e foi demonstrado que a proteína MSP3 β é altamente imunogênica, pois induziu altos títulos de anticorpos na presença de diferentes formulações de adjuvantes. Essa resposta foi independente da presença de LPS, pois camundongos TLR4 *knockout*, ou seja, não respondedores ao LPS, foram imunizados e foi verificado o mesmo padrão de resposta do que o encontrado nos camundongos normais (*Wild Type*) (ROMAGNOLI, 2011). Esses dados, em conjunto, ressaltam a função promissora desta proteína em uma estratégia de vacinação contra a malária.

5.3 Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1).

AMA-1 é uma proteína presente no micronema de parasitos do filo Apicomplexa, estando presente em todas as espécies de *Plasmodium*. O antígeno AMA-1 é sintetizado durante o ciclo assexuado sanguíneo, no final da esquizogonia, sendo direcionada aos micronemas e após a ruptura do esquizonte é direcionada para a superfície dos merozoítos (HODDER et al., 1996; revisto por REMARQUE et al., 2008). Esta proteína contém quatro regiões, sendo elas, pro-sequência, um ectodomínio rico em cisteína, um domínio transmembrana e uma região citoplasmática. No ectodomínio, as pontes dissulfeto, formadas pelos resíduos de cisteína, permitem sua separação em três domínios, denominados I, II e III (HODDER et al., 1996).

A proteína AMA-1 está envolvida na invasão dos parasitas do filo Apicomplexa nas células do hospedeiro, participando da formação da junção de movimento. A extremidade apical de cada célula do parasito se liga com a célula hospedeira, gerando essa junção de movimento que inclui as proteínas AMA-1, na superfície do parasito, e as proteínas do complexo da roptria (RON), composto pela RON-2, 4 e 5, que foram injetadas na membrana do hospedeiro pelo parasito. Foi visto que o ponto de ligação entre a proteína AMA-1 e o complexo RON é um *loop* de cisteína presente em AMA-1, que é conservado ao longo do filo Apicomplexa, e a proteína RON-2. Uma vez montado o complexo AMA-1-RON, forma-se uma estrutura em forma de anel, que em um processo impulsionado por um motor actina-miosina, é impulsionado para trás ao longo do parasito, completando assim a entrada do parasito na célula hospedeira (TOKIN et al., 2011; BAUM; COWMAN, 2011)

A importância biológica desta proteína pode ser destacada, pois tentativas de silenciamento do gene *ama-1* de *P. falciparum* e de *Toxoplasma gondi* geraram parasitas inviáveis (HEHL et al., 2000; TRIGLIA et al., 2000), demonstrando que essa proteína é essencial para a sobrevivência do parasita. Estudos realizados com o *P. berghei*, mostraram que esporozoítos sem a proteína AMA-1 conseguem invadir e se desenvolver nos hepatócitos, porém os merozoítos formados não conseguem invadir os eritrócitos, sugerindo assim que a proteína AMA-1 possui papel fundamental nesta etapa do ciclo, ou seja, na ligação, reorientação e na

estabilização da ligação ao eritrócito (SPATH; GIOVANNINI et al., dados não publicados).

Estudos imunoepidemiológicos conduzidos no Brasil têm mostrado que a proteína AMA-1 de *P. vivax* é altamente imunogênica em infecções naturais (THOMAS et al., 1994; RODRIGUES et al., 2005; MORAIS et al., 2006; MÚFALO et al., 2008). Posteriormente, foi demonstrado pelo nosso grupo que o domínio II de AMA-1 foi o mais reconhecido por anticorpos humanos, sendo este particularmente imunogênico durante a infecção natural (MÚFALO et al., 2008).

O potencial imunogênico da proteína AMA-1 foi observado, inicialmente, após a imunização de macacos *Rhesus* com a proteína nativa purificada de *P. knowlesi*, a qual foi capaz de induzir proteção significativa contra a infecção (DEANS et al., 1988). Posteriormente, a imunização de camundongos ou macacos com proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 de *Plasmodium chabaudi* (ANDERS, et al., 1998) ou *Plasmodium fragile* (COLLINS, et al., 1994), respectivamente, foi capaz de induzir proteção significativa contra a infecção.

A eficiência protetora de AMA-1 também foi verificada após a imunização de macacos *Aotus vociferans* com AMA-1 de *P. falciparum* expresso em *Pichia pastoris* e desafiados com dose letal do parasita. A proteção induzida pela imunização foi considerada efetiva, pois foi capaz de manter a parasitemia baixa em relação ao grupo não imunizado (STOWERS, et al., 2002). Além disso, a imunização de coelhos com proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 induziu a produção de anticorpos capazes de inibir a invasão do merozoíto de *P. falciparum* *in vitro* (HODDER et al., 2001; DUTTA et al., 2002; KOCKEN et al., 2002; KENNEDY et al., 2002; LALITHA et al., 2004; DUTTA et al., 2005).

Recentemente, nosso grupo expressou e purificou a proteína AMA-1 de *P. vivax*, a partir de um sistema de expressão secretada em *Pichia pastoris*. Essa proteína mostrou-se altamente imunogênica quando testada com soros de indivíduos de diferentes áreas do estado do Pará, infectados com *P. vivax*. Além disso, as imunizações experimentais utilizando protocolo homólogo e heterólogo de indução e reforço com DNA e/ou proteína recombinante, demonstraram que ao final do esquema de imunizações essa proteína é capaz de estimular a produção de altos títulos de anticorpos em camundongos (VICENTIN, 2012).

Imunizações pré-clínicas, utilizando a proteína AMA-1, estão sendo conduzidas. Esses ensaios têm demonstrado uma significativa proteção após o desafio, com o estágio sanguíneo do parasito, esse fato se repete com diferentes espécies do *Plasmodium*, tornando essa proteína um excelente candidato à vacina. A tabela abaixo mostra um resumo dos principais ensaios de imunizações experimentais feitos com a proteína AMA-1.

Tabela 3 - Sumário das imunizações experimentais com a proteína AMA-1.

Espécie	Modelo	Tipo de antígeno	Resultado	Referência
<i>P. knowlesi</i>	Macaco	Proteína nativa	Proteção contra a infecção	DEANS et al. (1988)
<i>P. fragile</i>	Macaco	Proteína recombinante	Proteção contra a infecção	COLLINS et al. (1994)
<i>P. chabaudi</i>	Camundongo	Proteína recombinante	Proteção contra a infecção por cepas homólogas	CREWETHER et al. (1996)
<i>P. chabaudi</i>	Camundongo	Proteína recombinante	Proteção contra a infecção	ANDERS et al. (1998)
<i>P. yoelii</i>	Camundongo	Proteína nativa	Proteção contra a infecção	NARUM et al. (2000)
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de inibir a invasão de eritrócitos <i>in vitro</i>	HODDER et al. (2001)
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de inibir o crescimento do parasito <i>in vitro</i> .	DUTTA et al. (2002)
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de bloquear o crescimento das cepas dos parasitas homólogos	KENNEDY et al. (2002)
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína recombinante	Inibição da invasão de eritrócitos por parasitas homólogos	KOCKEN et al. (2002)
<i>P. falciparum</i>	Macaco	Proteína recombinante	Proteção contra a infecção	STOWERS et al. (2002)

Continuação: Tabela 3- Sumário das imunizações experimentais com a proteína AMA-1.

Espécie	Modelo	Tipo de antígeno	Resultado	Referência
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de inibir o processamento proteolítico da proteína e consequentemente a invasão ao eritrócito.	DUTTA et al. (2003)
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de inibir a invasão de eritrócitos	LALITHA et al. (2004)
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína recombinante	Anticorpos capazes de inibir a invasão ao eritrócito	DUTTA et al. (2005)
<i>P. falciparum</i>	Camundongo e Coelho	Proteína Recombinante	Indução de resposta celular e humoral. Anticorpos capazes de inibir a invasão de eritrócitos/ crescimento <i>in vitro</i>	LALITHA et al. (2008)
<i>P. falciparum</i>	Macaco	Proteína Recombinante	Proteção contra a infecção por cepas de parasitas homólogos	DUTTA et al. (2009)
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Adenovirus	Anticorpos capazes de inibir o crescimento do parasito <i>in vitro</i>	BRUDER et al. (2010)
<i>P. falciparum</i>	Macaco	Proteína Recombinante	Anticorpos capazes de inibir a invasão de eritrócitos/ crescimento <i>in vitro</i>	KUSI et al. (2011)
<i>P. vivax</i>	Camundongo	DNA plasmidial	Anticorpos reconhecem a proteína nativa por imunofluorescência	ROGERS et al. (1999)
<i>P. vivax</i>	Macaco	Proteína recombinante	Altamente imunogênica	KOCKEN et al. (1999)
<i>P. vivax</i>	Camundongo	Proteína recombinante	Altamente imunogênica	MUFALO et al. (2008)
<i>P. vivax</i>	Camundongo	Proteína recombinante	Altamente imunogênica	GENTIL et al. (2010)
<i>P. vivax</i>	Camundongo	Proteína recombinante e Adenovirus	Intensa e duradoura resposta de anticorpos e proliferação de células T de memória	BOUILLET et al. (2011)

Continuação: Tabela 3- Sumário das imunizações experimentais com a proteína AMA-1.

Espécie	Modelo	Tipo de antígeno	Resultado	Referência
<i>P. vivax</i>	Camundongo	DNA plasmidial	Indução de proliferação de linfócitos T CD8 ⁺	KIM et al. (2011)
<i>P. vivax</i>	Camundongo	Proteína recombinante	Altamente imunogênica	VICENTIN (2012)

Devido o complexo ciclo de vida do *P. vivax* e a necessidade do desenvolvimento de novas abordagens para o controle da malária o foco principal deste trabalho foi realizar imunizações pré-clínicas contendo uma combinação de potenciais antígenos e também verificar a longevidade da resposta imune estimulada pelas formulações vacinais testadas.

II. Objetivos

1. Objetivo Geral

Analisar a resposta imune humoral induzida em camundongos pela imunização com antígenos recombinantes de *P. vivax*, tendo como foco principal proteínas de superfície de merozoítos.

2. Objetivos Específicos

2.1 Expressar e purificar as proteínas recombinantes MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE MSP3 β e AMA-1 de *P. vivax*;

2.2 Imunizar camundongos com as proteínas recombinantes administradas individualmente ou em combinação na presença de adjuvante;

2.3 Analisar comparativamente a resposta imune humoral dos animais imunizados com as proteínas administradas individualmente com a dos animais imunizados com a combinação das três proteínas;

2.4 Acompanhar a longevidade da resposta imune humoral gerada pelas imunizações experimentais, por 6 meses.

III. Material e Métodos

1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes MSP1₁₉ (com e sem o epítipo PADRE) e MSP3 β foram produzidas em bactérias *E. coli*, conforme descrito anteriormente pelo nosso grupo (CUNHA et al., 2001; JIMENEZ et al., 2008). Por outro lado, a proteína AMA-1 foi produzida através de um sistema de expressão secretada em *Pichia pastoris* (VICENTIN, 2012). A tabela 4 apresenta um sumário das proteínas recombinantes expressas nesse trabalho.

Tabela 4 – Sumário das proteínas recombinantes expressas.

Nome da Proteína	Fração da proteína expressa	Aminoácidos (aa)	Vetor de expressão selecionado	Espécie / Linhagem	Massa molecular aparente (kDa)
MSP1 ₁₉ / MSP1 ₁₉ - PADRE	Região C-terminal	1616–1704	pET-14b	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	19
MSP3 β	Domínio central rico em alanina	35 - 654	pET-14b	<i>E. coli</i> ROSETTA (DE3)	104
AMA-1	Ectodomínio inteiro	43 - 387	pPIC9K	<i>Pichia pastoris</i> GS115	53

PADRE: AKFVAAWTLKAAA (CUNHA et al., 2001)

1.1 MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β

Para expressão das proteínas recombinantes MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β as bactérias *E. coli* foram inicialmente cultivadas em 70 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB), por um período de aproximadamente 16 horas à 37°C. Para expressão a partir da bactéria BL21 (DE3, Novagen) foi acrescentado, ao meio de cultura, o antibiótico ampicilina a 100 μ g/mL, já para expressão a partir da bactéria ROSETTA (Novagen) além da ampicilina (100 μ g/mL) foi adicionado cloranfenicol (35 μ g/mL) ao meio de cultura.

Após esse período a cultura foi diluída na proporção de 1:50 em meio LB, suplementado com os respectivos antibióticos, e mantida sob agitação constante à 37°C até atingir a DO_{600} de 0,6-0,8. A seguir, induzimos a expressão das proteínas com a adição de 0,1 mM de isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG, Invitrogen) por 4 horas à 37°C. Após esse período, a cultura bacteriana foi centrifugada a 3.500 rpm por 15 minutos, à 4°C, e o precipitado ressuspendido em tampão de lise/sonicação (anexo 1). As bactérias foram lisadas, em banho de gelo, com auxílio de um sonicador (Virtis Virsonic) aplicando-se 4 ciclos de 3 minutos, em pulso constante, e intervalos de 1 minuto entre os pulsos. A seguir, o extrato bacteriano foi centrifugado à 3.500 rpm, por 30 minutos a 4°C. As frações obtidas (precipitado e sobrenadante) foram analisadas por separação eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% para a proteína MSP1₁₉ e SDS-PAGE 12% para a proteína MSP3 β .

O sobrenadante foi purificado por cromatografia de afinidade utilizando-se para isso a resina de Ni²⁺-NTA (Qiagen), equilibrada previamente com o tampão de lise/sonicação. Após a passagem do sobrenadante, a resina foi lavada com o tampão de lavagem e submetida a um gradiente linear de imidazol (0 a 400 mM) em tampão de lavagem. Durante todo o processo o material eluído da coluna foi coletado, as frações foram analisadas por separação eletroforética em gel de poliacrilamida.

As frações que continham a proteína foram reunidas e aplicadas novamente na coluna a fim de obtermos preparações mais puras. Novamente todo o material eluído foi analisado em SDS-PAGE e as frações contendo a proteína foram dialisadas contra 20 mM Tris-HCl pH 8,0. Após a diálise, a proteína foi filtrada com membrana de 0,45 μ m e purificada por cromatografia de troca iônica, utilizando a Coluna Q FF (GE), previamente equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 8,0, que estava acoplada a um equipamento de FPLC (ÄKTA prime plus, GE). A proteína foi eluída com um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl, neste mesmo tampão. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE, as que continham a proteína foram dialisadas contra PBS com 0,1M de PMSF. A concentração das proteínas foi determinada em gel de poliacrilamida, utilizando curva padrão com Soro Albumina Bovina (BSA).

1.2 AMA-1

A proteína AMA-1 foi obtida por expressão secretada utilizando-se a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (GS115, Invitrogen). Inicialmente cultivamos a levedura em 200 mL de meio BMGY (anexo 1), sob agitação constante (230 rpm) e com temperatura de 30°C, até atingir a DO₆₀₀ entre 2 a 6. A cultura foi centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos e o precipitado formado foi ressuspendido em 1 litro de meio BMMY (anexo 1). Uma nova incubação foi realizada a 30°C por 72 horas, sob agitação constante. A indução da expressão da proteína foi mantida pela adição diária de metanol na concentração final de 1%. Ao final desse período, a cultura foi centrifugada a 3.000 rpm por 15 minutos, para obtenção do sobrenadante, o qual continha a proteína AMA-1.

O sobrenadante da cultura foi filtrado com membrana de 0,45 µm (Nalgene) e posteriormente concentrado em filtros AMICON[®] Ultra (Milipore) de 30 kDa para um volume 10 vezes menor que o volume inicial. O sobrenadante concentrado foi dialisado contra tampão de equilíbrio (anexo 1) durante a noite, sobre agitação constante e temperatura de 4°C.

Após a diálise o sobrenadante foi purificado por cromatografia de afinidade utilizando-se a resina de níquel, que foi previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio. Após a passagem do sobrenadante, a resina foi lavada com o tampão de lavagem (anexo 1) e submetida a um gradiente linear de imidazol (0 a 400 mM) em tampão de lavagem. Todas as frações eluídas foram analisamos por SDS-PAGE e aquelas que continham a proteína foram reunidas e dialisadas contra 20 mM Tris-HCl pH 8,0. Após a diálise, a proteína foi filtrada com membrana de 0,45µm e purificada por cromatografia de troca iônica, utilizando a Coluna Q FF (GE), previamente equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 8,0, acoplada ao sistema ÄKTA prime plus (GE). A proteína foi eluída com um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl, neste mesmo tampão. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE, as que continham a proteína foram dialisadas contra PBS. A concentração da proteína foi determinada em gel de poliacrilamida, utilizando curva padrão com BSA.

2. Análise das proteínas recombinantes por cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa

Para verificar o grau de pureza das proteínas MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE, MSP3 β e AMA-1 foi realizada a análise das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa (RP-HPLC), em colaboração com a professora Isabel Correia Batista, do Instituto Butantan. Para isso, foi utilizada a coluna C4 Vydac. A eluição foi feita utilizando-se um gradiente composto pelas soluções A (0,1% de TFA em água) e solução B (0,1% de TFA em 90% de acetonitrila), a análise foi realizada a temperatura ambiente. A eluição foi monitorada através de um detector UV-visível (Shimadzu SPD M20A) com comprimento de onda de 214 nm.

3. Imunizações experimentais

Grupos de 6 camundongos isogênicos BALB/c (H-2^d) ou C57BL/6 (H-2^b) fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas, provenientes do Biotério da FCF-IQ/USP foram utilizados para as imunizações experimentais. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da FCF/USP em abril de 2011 (protocolo CEUA/FCF/302).

Cada animal recebeu 3 doses, sendo cada uma de 10 μ g de proteína recombinante num volume final de 0,1 mL com intervalo de 15 dias. Os animais que foram injetados com a combinação das três proteínas receberam doses de 30 μ g por camundongo. As imunizações foram feitas por via subcutânea, na base da cauda, com auxílio de seringas de insulina U-100, contendo o antígeno emulsificado na presença do adjuvante Quil A (Superfos Biosector, Vedbaek, Denmark) na quantidade de 25 μ g por animal ou na presença do adjuvante Poly I:C (InvivoGen) com uma concentração de 50 μ g por animal. Os esquemas de imunizações estão apresentados nas tabelas a seguir.

Tabela 5 - Esquema de imunização dos camundongos BALB/c com cada uma das proteínas individualmente ou em combinação.

Indução	Reforço (2 doses)
MSP1 ₁₉ + Quil A	MSP1 ₁₉ + Quil A
MSP3 β + Quil A	MSP3 β + Quil A
AMA-1 + Quil A	AMA-1 + Quil A
MSP1 ₁₉ + MSP3 β + AMA-1 + Quil A	MSP1 ₁₉ + MSP3 β + AMA-1 + Quil A

Indução	Reforço (2 doses)
MSP1 ₁₉ -PADRE + Poly I:C	MSP1 ₁₉ -PADRE + Poly I:C
MSP3 β + Poly I:C	MSP3 β + Poly I:C
AMA-1 + Poly I:C	AMA-1 + Poly I:C
MSP1 ₁₉ -PADRE + MSP3 β + AMA-1 + Poly I:C	MSP1 ₁₉ -PADRE + MSP3 β + AMA-1 + Poly I:C

Tabela 6 - Esquema de imunização dos camundongos C57BL/6 com cada uma das proteínas individualmente ou em combinação.

Indução	Reforço (2 doses)
MSP1 ₁₉ + Quil A	MSP1 ₁₉ + Quil A
MSP1 ₁₉ -PADRE + Quil A	MSP1 ₁₉ -PADRE + Quil A
MSP3 β + Quil A	MSP3 β + Quil A
AMA-1 + Quil A	AMA-1 + Quil A
MSP1 ₁₉ + MSP3 β + AMA-1 + Quil A	MSP1 ₁₉ + MSP3 β + AMA-1 + Quil A
MSP1 ₁₉ -PADRE + MSP3 β + AMA-1 + Quil A	MSP1 ₁₉ -PADRE + MSP3 β + AMA-1 + Quil A

Indução	Reforço (2 doses)
MSP1 ₁₉ -PADRE + Poly I:C	MSP1 ₁₉ -PADRE + Poly I:C
MSP3 β + Poly I:C	MSP3 β + Poly I:C
AMA-1 + Poly I:C	AMA-1 + Poly I:C
MSP1 ₁₉ -PADRE + MSP3 β + AMA-1 + Poly I:C	MSP1 ₁₉ -PADRE + MSP3 β + AMA-1 + Poly I:C

Passado duas semanas de cada imunização, o sangue dos animais foi coletado, por via submandibular, para obtenção dos soros os quais foram estocados a - 20°C até sua utilização. Para os estudos de longevidade da resposta de

anticorpos, o sangue dos animais foi coletado nos períodos indicados no esquema a seguir.

4. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os títulos de anticorpos IgG específicos contra as proteínas recombinantes MSP1₁₉, MSP3 β e AMA-1 foram determinados por ELISA de acordo como descrito anteriormente pelo nosso grupo (MÚFALO et al., 2008; GENTIL et al., 2010).

Placas de 96 poços ("high binding", Costar 3590) foram sensibilizadas com 2 μ g/mL de cada uma das proteínas recombinantes em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M (pH 9,6), em um volume final de 50 μ L/poço. As placas foram incubadas, durante a noite, a temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS-Tween (anexo 1) por 3 vezes. A seguir, foi adicionado 200 μ L/poço da solução de bloqueio (anexo 1). As placas foram incubadas a 37°C por 2 horas. Depois desse período foi adicionado 50 μ L/poço de cada um dos soros diluídos a partir de 1:100 em solução de bloqueio, e uma nova incubação de 1 hora foi realizada à temperatura ambiente.

As placas novamente foram lavadas com PBS-Tween, após essa etapa foi adicionado 50 μ L/poço do anticorpo secundário conjugado a peroxidase (IgG de cabra anti-IgG de camundongo, KPL) diluído 1:3.000, em solução de bloqueio. Em seguida, outra incubação foi realizada por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e foram adicionados 100 μ L/poço da solução de revelação (anexo 1). A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μ L/poço de H₂SO₄ 4N.

Os títulos específicos de anticorpos contra as proteínas recombinantes foram definidos como a maior diluição com uma DO₄₉₂ superior a 0,1, a DO foi determinada

em uma leitora de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA). Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos em $\log_{10} \pm$ erro padrão da média.

A detecção dos anticorpos IgG1, IgG2a e IgG2c, nos camundongos imunizados foi realizada como descrito acima, substituindo o anticorpo secundário por anticorpos isotipo-específicos de camundongo (anti-IgG1, anti-IgG2a para os animais da linhagem BALB/c e anti-IgG2c para os animais da linhagem C57BL/6) conjugados a peroxidase (Southern Technologies) em uma diluição de 1:8.000 (anti-IgG1 e IgG2a) e 1:2.000 (anti-IgG2c). A determinação dos isotipos de IgG foi realizada em três animais de cada um dos grupos experimentais. O título individual foi determinado como sendo a maior diluição do soro que apresentava DO_{492} maior do que 0,1. Os resultados foram expressos como as médias das razões dos títulos de anticorpos.

5. Análise estatística

A análise estatística foi determinada, através do programa GraphPad PRISM 4 onde foi determinado a média dos grupos e erro padrão da média. O teste de Tukey, one-way ANOVA, foi utilizado para comparar diferenças estatísticas entre as médias dos grupos imunizados.

IV. Resultados

1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes MSP1₁₉ (com ou sem o epítipo PADRE), MSP3 β e AMA-1 foram expressas e purificadas como descrito no item Materiais e Métodos.

No processo de purificação por cromatografia de afinidade, as proteínas MSP1₁₉ e MSP1₁₉-PADRE foram eluídas na fração de 400 mM de imidazol. Posteriormente, as proteínas foram purificadas por cromatografia de troca iônica. O perfil de eluição da proteína MSP1₁₉ é mostrado na figura 3A e o perfil de eluição da MSP1₁₉-PADRE mostrou-se idêntico (dados não mostrados).

A expressão e purificação das proteínas foram avaliadas em SDS-PAGE 15%, na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol (2-ME), conforme mostrado na figura 3B. O elevado grau de pureza das amostras foi confirmado por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC), os cromatogramas das figuras 3C e 3D, estão apresentados como absorbância *versus* tempo de retenção e mostram picos majoritários para ambas as proteínas.

(A)

(B)

Figura 3 - Análise da expressão e purificação das proteínas recombinantes MSP1₁₉ (1) e MSP1₁₉-PADRE (2) produzidas em *E. coli*. (A) Perfil de eluição da proteína MSP1₁₉ através da cromatografia de troca iônica, em coluna Q FF (GE), acoplada ao sistema ÄKTA prime plus (GE); O perfil de eluição da proteína MSP1₁₉-PADRE foi idêntico (dados não mostrados). (B) Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie apresentando o perfil de migração das proteínas recombinantes MSP1₁₉ (1) e MSP1₁₉-PADRE (2), após purificação por cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica; Análise do perfil da purificação das proteínas recombinantes MSP1₁₉ (C) e MSP1₁₉-PADRE (D) em RP-HPLC, utilizando coluna C4 (Vydac). As proteínas foram eluídas sob gradiente de acetonitrila contendo as soluções A (0,1% de TFA em água) e B (0,1% de TFA em 90% de acetonitrila).

Durante o processo de purificação por cromatografia de afinidade, a proteína recombinante MSP3 β foi eluída na fração de 400 mM de imidazol. O perfil de eluição da proteína na cromatografia de troca iônica é mostrado na figura 4A. A expressão e purificação da MSP3 β foram avaliadas em SDS-PAGE 12%, na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol (2-ME), conforme mostrado na figura 4B. O grau de pureza da amostra foi analisado por RP-HPLC e a figura 4C mostra o cromatograma gerado com os dados de absorbância *versus* tempo de retenção. Nota-se um pico

majoritário, o que demonstra que a amostra estava com um perfil adequado para o início dos ensaios de imunizações.

Figura 4 - Análise da expressão e purificação da proteína recombinante MSP3 β produzida em *E. coli*. (A) Perfil de eluição da proteína através da cromatografia de troca iônica, em coluna Q FF (GE), acoplada ao sistema ÄKTA prime plus (GE); (B) Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie apresentando o perfil de migração da proteína recombinante MSP3 β , após purificação por cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica; (C) Análise do perfil de eluição da proteína recombinante MSP3 β por RP-HPLC sob gradiente de acetonitrila, contendo as soluções A (0,1% de TFA em água) e B (0,1% de TFA em 90% de acetonitrila).

A proteína recombinante AMA-1 foi obtida por expressão secretada na levedura *Pichia pastoris*. O sobrenadante da cultura de leveduras foi concentrado e posteriormente purificado em duas etapas. Inicialmente, por cromatografia de afinidade, onde a proteína foi eluída na fração de 100 mM de imidazol e em seguida por cromatografia de troca iônica que gerou o cromatograma mostrado na figura 5A. A expressão e purificação da proteína foram avaliadas em SDS-PAGE 12%, na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol (2-ME), conforme mostrado na figura 5B.

A análise cromatográfica da proteína AMA-1 resultou em um cromatograma com um pico majoritário revelando assim o elevado grau de pureza da amostra. A figura 5C mostra o cromatograma gerado com absorbância *versus* tempo de retenção.

(A)

(B)

(C)

Figura 5 - Análise da expressão e purificação da proteína recombinante AMA-1 produzida em *Pichia pastoris*. (A) Perfil de eluição da proteína através da cromatografia de troca iônica, em coluna Q FF (GE), acoplada ao sistema ÄKTA prime plus (GE); (B) Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie apresentando o perfil de migração da proteína recombinante AMA-1, após purificação por cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica; (C) Análise do perfil de eluição da proteína recombinante AMA-1 por RP-HPLC sob gradiente de acetonitrila, contendo as soluções A (0,1% de TFA em água) e B (0,1% de TFA em 90% de acetonitrila).

2. Análise comparativa da resposta imune humoral induzida após imunização com as proteínas recombinantes administradas isoladamente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Quil A.

As imunizações experimentais foram conduzidas em duas linhagens de camundongos (BALB/c e C57BL/6). Com o intuito de explorarmos as diversidades genéticas encontradas nos mesmos, que podem implicar em um diferente perfil de reconhecimento e de resposta aos antígenos testados, assim como de suas combinações, uma vez que as linhagens testadas possuem diferentes haplotipos de MHC, H-2^b para os camundongos C57BL/6 e H-2^d para os camundongos BALB/c. Assim podemos extrapolar, com mais confiança, os resultados obtidos com o que aconteceria quando a vacina fosse aplicada na população, que é heterogênea.

2.1 Resposta imune humoral gerada em camundongos BALB/c.

Na figura 6 estão apresentados os títulos de anticorpos específicos, obtidos em camundongos BALB/c, imunizados com as proteínas AMA-1, MSP1₁₉ e MSP3β administradas individualmente ou em combinação, emulsificadas em Quil A.

Conforme podemos observar, após a terceira dose, os animais que receberam cada uma das proteínas administradas isoladamente apresentaram altos títulos de anticorpos contra as proteínas homólogas. Em relação aos animais que receberam a combinação dos três antígenos, não houve diferença estatisticamente significativa nos títulos de IgG contra as proteínas AMA-1 e MSP3 β , quando comparado com o grupo que recebeu as mesmas proteínas administradas isoladamente. No entanto, quando testamos os soros dos animais imunizados com a mistura de antígenos contra a proteína MSP1₁₉ observamos uma redução estatisticamente significativa nos títulos de anticorpos ($P < 0,001$) quando comparado com o grupo que recebeu somente a MSP1₁₉.

Figura 6 – Análise comparativa dos títulos de anticorpos IgG induzidos em camundongos BALB/c após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1₁₉ e MSP3 β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Quil A. Os títulos de anticorpos foram determinados por ELISA, 14 dias após cada imunização, utilizando placas cobertas com as proteínas AMA-1 (A), MSP1₁₉ (B) ou MSP3 β (C). Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos em log₁₀ $\pm$ erro padrão da média, os quais foram comparados pelo teste de Tukey (one-way ANOVA). ns = não significativo ($P > 0,05$), *** = $P < 0,001$.

Os títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a nos soros dos animais que receberam 3 doses foram determinados por ELISA, conforme descrito no item Materiais e Métodos. A análise dos resultados demonstra que houve um equilíbrio entre os títulos desses anticorpos, indicando assim que a vacinação induziu um padrão de resposta mista Th1/Th2, em todos os grupos testados. A figura 7 mostra a média das razões entre os títulos de IgG1 e IgG2a.

Figura 7 – Avaliação do perfil de anticorpos IgG1 e IgG2a de camundongos BALB/c após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1₁₉ e MSP3 β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Quil A. Os títulos de anticorpos foram determinados por ELISA, utilizando placas cobertas com as proteínas AMA-1 (A), MSP1₁₉ (B) ou MSP3 β (C). Os resultados foram expressos como a razão IgG1/IgG2a $\pm$ erro padrão da média, os quais foram comparados pelo teste de Tukey (one-way ANOVA). ns = não significativo ($P > 0,05$), *** = $P < 0,001$.

Com o intuito de avaliar a longevidade da resposta imune induzida pelas imunizações experimentais, os animais foram acompanhados por 6 meses após a terceira dose das imunizações. Nas figuras a seguir, mostramos os resultados expressos como médias de títulos de IgG ($\log_{10}$).

Figura 8 – Longevidade da resposta de anticorpos IgG de camundongos BALB/c após a imunização com as proteínas AMA-1, MSP1₁₉ e MSP3 β administradas isoladamente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Quil A. (A) Títulos de anticorpos IgG dos animais imunizados com as proteínas administradas individualmente até o final do seguimento; (B) Títulos de anticorpos IgG dos animais imunizados com a combinação dos três antígenos até o final do acompanhamento.

Quando comparamos os títulos de anticorpos obtidos após a terceira dose (dia 45) com os títulos de anticorpos obtidos após 6 meses da administração da vacina (dia 210), podemos observar que não houve redução significativa ($P>0,05$) nos títulos de IgG no grupo que recebeu a proteína MSP1₁₉ administrada isoladamente. Já os grupos que receberam as proteínas MSP3 β e AMA-1 emulsificadas no adjuvante Quil A apresentaram uma redução nos títulos de anticorpos ($P<0,05$).

Interessantemente, o grupo que recebeu a combinação das três proteínas, emulsificadas no adjuvante Quil A, não apresentou redução nos títulos dos anticorpos IgG, entre os dias 45 e 210 do acompanhamento, quando testado contra os três antígenos, ressaltando assim uma vantagem na combinação das proteínas.

2.2 Resposta imune humoral gerada em camundongos C57BL/6.

O efeito do uso combinado dos três antígenos também foi avaliado após imunização de uma segunda linhagem de camundongo (C57BL/6, H-2^b). A figura 9 mostra os resultados obtidos nos grupos de camundongos imunizados com as proteínas AMA-1, MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β administradas individualmente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Quil A. Acrescentamos nesse grupo experimental a proteína MSP1₁₉-PADRE, pois estudos anteriores mostraram que essa linhagem de camundongo desenvolve uma forte resposta de células T para o epítipo PADRE (ROSA et al., 2004).

Figura 9 – Análise comparativa dos títulos de anticorpos IgG de camundongos C57BL/6 após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Quil A. Os títulos de anticorpos foram determinados por ELISA, utilizando placas cobertas com as proteínas AMA-1 (A), MSP1₁₉ (B) ou MSP3 β (C). Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos em $\log_{10} \pm$ erro padrão da média, os quais foram comparados pelo teste de Tukey (one-way ANOVA). ns = não significativo.

Como observado na figura 9, após a terceira dose as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β foram altamente imunogênicas nos camundongos C57BL/6 quando administradas isoladamente, ou em combinação, não ocorrendo redução significativa nos títulos de anticorpos com a mistura dos antígenos ($P>0,05$, em todos os casos). Esses dados demonstram que a linhagem C57BL/6 é a mais apropriada para as imunizações experimentais com a MSP1₁₉, já que na linhagem BALB/c houve um comprometimento da resposta. Além disso, observamos que a imunização com as proteínas MSP1₁₉ e MSP1₁₉-PADRE demonstrou que a presença do epítipo PADRE não aumentou significativamente os títulos de anticorpos após a terceira dose do antígeno ($P>0,05$), como já havíamos demonstrado anteriormente (CUNHA et al., 2001; ROSA et al., 2004).

Passado 14 dias da terceira dose os títulos das subclasses IgG1 e IgG2c foram determinados por ELISA, conforme descrito no item Materiais e Métodos. A análise dos resultados demonstra que houve um equilíbrio entre os títulos desses anticorpos, indicando assim que a vacinação induziu um padrão de resposta mista Th1/Th2, em todos os grupos testados. A figura 10 mostra a média das razões entre os títulos de IgG1 e IgG2c.

Figura 10 – Avaliação do perfil de anticorpos IgG1 e IgG2c de camundongos C57BL/6 após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Quil A. Os títulos de anticorpos foram determinados por ELISA, utilizando placas cobertas com as proteínas AMA-1 (A), MSP1₁₉ (B) ou MSP3 β (C). Os resultados foram expressos como a razão IgG1/IgG2a $\pm$ erro padrão da média, os quais foram comparados pelo teste de Tukey (one-way ANOVA). ns = não significativo ($P>0,05$), ** = $P<0,01$.

Com o objetivo de se avaliar a longevidade da resposta imunológica gerada os animais foram acompanhados por 6 meses após a terceira dose das imunizações. Nas figuras abaixo, mostramos os resultados expressos como médias dos títulos de IgG ($\log_{10}$).

Figura 11 – Longevidade da resposta de anticorpos IgG de camundongos C57BL/6 após a imunização com as proteínas AMA-1, MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β administradas isoladamente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Quil A. (A) Títulos de anticorpos IgG dos animais imunizados com as proteínas administradas individualmente até o sexto mês do acompanhamento; (B) Títulos de anticorpos IgG dos animais imunizados com a combinação dos três antígenos até o sexto mês de acompanhamento. Os símbolos sólidos representam a combinação de antígenos contendo a MSP1₁₉ e os símbolos abertos a MSP1₁₉-PADRE. Os símbolos redondos representam as respostas de anticorpos anti-AMA-1, os triângulos anti-MSP1₁₉ e o quadrados anti-MSP3 β .

As proteínas recombinantes AMA-1, MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β foram altamente imunogênicas nos camundongos C57BL/6 quando administradas isoladamente, ou em combinação, sendo que a resposta de anticorpos IgG nesses animais foi duradoura, não houve redução estatisticamente significativa, entre os títulos medidos após a terceira imunização e o sexto mês de acompanhamento, nos grupos imunizados com as proteínas MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β , administradas isoladamente, ou em combinação ($P > 0,05$). No entanto, verificamos uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,01$) nos títulos de anticorpos anti-AMA-1 no grupo imunizado apenas com a proteína AMA-1 e no grupo que recebeu a combinação desses antígenos composta pela MSP1₁₉-PADRE, já o grupo que recebeu a mistura de antígenos com a MSP1₁₉ não apresentou essa redução nos títulos de anticorpos anti-AMA-1.

3. Análise comparativa da resposta imune humoral induzida após imunização com as proteínas recombinantes administradas isoladamente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Poly I:C.

Com o intuito de se avaliar a imunogenicidade dessas proteínas administradas isoladamente ou em combinação, visando futuros testes em primatas não humanos e no próprio homem, iniciamos novos testes de imunizações pré-clínicas em camundongos BALB/c e C57BL/6 utilizando o adjuvante Poly I:C que está em fase de testes em humanos (VERDIJK et al., 1999).

3.1 Resposta imune humoral gerada em camundongos BALB/c

Nas figuras abaixo mostramos os resultados obtidos nos grupos de camundongos BALB/c, imunizados com as proteínas AMA-1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β administradas individualmente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Poly I:C.

Figura 12 – Análise comparativa dos títulos de anticorpos IgG de camundongos BALB/c após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Poly I:C. Os títulos de anticorpos foram determinados por ELISA, 14 dias após cada imunização, utilizando placas cobertas com as proteínas AMA-1 (A), MSP1₁₉ (B) ou MSP3β (C). Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos em $\log_{10} \pm$ erro padrão da média, os quais foram comparados pelo teste de Tukey (one-way ANOVA). ns = não significativo ($P > 0,05$), ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

Conforme observado na figura, após a terceira dose, os animais que receberam cada uma das proteínas administradas isoladamente apresentaram expressivos títulos de anticorpos IgG, porém mais baixos dos que os obtidos anteriormente na presença do adjuvante Quil A.

Não houve diferença significativamente estatística, nos títulos de IgG, dos animais imunizados com a combinação dos três antígenos quando testados apenas contra a MSP3β, quando comparado com o grupo que recebeu a mesma proteína administrada isoladamente. Já quando testamos os soros dos animais imunizados com o *pool* de antígenos contra a proteína MSP1₁₉ e AMA-1 observamos uma redução estatisticamente significativa na produção dos anticorpos ($P > 0,001$ e $P > 0,01$, respectivamente) quando comparado com os grupos que receberam somente as respectivas proteínas administradas isoladamente, emulsificadas no adjuvante Poly I:C.

As subclasses IgG1 e IgG2a foram determinadas por ELISA, 14 dias após a terceira imunização. Os resultados foram expressos como a razão entre os títulos desses anticorpos. Como podemos notar na figura 13, houve um equilíbrio entre as

quantidades de IgG1 e IgG2a indicando assim um tipo de resposta mista Th1/Th2 para todos os grupos testados.

Figura 13 – Avaliação do perfil de anticorpos IgG1 e IgG2a de camundongos BALB/c após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Poly I:C. Os títulos de anticorpos foram determinados por ELISA, utilizando placas cobertas com as proteínas AMA-1 (A), MSP1₁₉ (B) ou MSP3 β (C). Os resultados foram expressos como a razão IgG1/IgG2a $\pm$ erro padrão da média, os quais foram comparados pelo teste de Tukey (one-way ANOVA). ns = não significativo ($P>0,05$).

Com o intuito de avaliar a longevidade da resposta imune gerada por esse protocolo de imunização experimental, os títulos de IgG desses animais foram avaliados por até 6 meses depois da última imunização. A figura 14, mostra os resultados expressos como médias de títulos de IgG ($\log_{10}$).

Figura 14 – Longevidade da resposta de anticorpos IgG de camundongos BALB/c após a imunização com as proteínas AMA-1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β administradas isoladamente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Poly I:C. (A) Títulos de anticorpos IgG dos animais imunizados com as proteínas administradas individualmente até o final do seguimento; (B) Títulos de anticorpos IgG dos animais imunizados com a combinação dos três antígenos até o final do acompanhamento.

Quando comparamos os títulos de anticorpos obtidos após a terceira dose da formulação vacinal, com os títulos de anticorpos obtidos no último mês do acompanhamento, observamos que não houve redução dos títulos de IgG em todos os grupos testados, mostrando com isso que a resposta gerada contra as três proteínas é duradoura, tanto nos animais imunizados com as proteínas administradas individualmente como no grupo que recebeu a combinação delas.

3.2 Resposta imune humoral gerada em camundongos C57BL/6

A figura 15 mostra os resultados obtidos nos grupos de camundongos C57BL/6, imunizados com as proteínas AMA-1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β administradas individualmente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Poly I:C.

Figura 15 - Análise comparativa dos títulos de anticorpos IgG de camundongos C57BL/6 após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Poly I:C. Os títulos de anticorpos foram determinados por ELISA, 14 dias após cada imunização, utilizando placas cobertas com as proteínas AMA-1 (A), MSP1₁₉ (B) ou MSP3β (C). Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos em $\log_{10} \pm$ erro padrão da média, os quais foram comparados pelo teste de Tukey (one-way ANOVA). ns = não significativo ($P > 0,05$), ** = $P < 0,01$.

Após a terceira dose da formulação vacinal, os animais imunizados com as proteínas administradas isoladamente, emulsificadas no adjuvante Poly I:C, desenvolveram altos títulos de anticorpos IgG. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) quando comparamos os títulos de IgG dos animais imunizados apenas com a proteína AMA-1 ou MSP1₁₉-PADRE com os títulos dos animais imunizados com a combinação das três proteínas quando testados contra as proteínas AMA-1 ou MSP1₁₉-PADRE, respectivamente.

Interessantemente, observamos um aumento significativo ($P < 0,01$) nos títulos de anticorpos dos animais que receberam a combinação dos antígenos contra a proteína MSP3β quando comparado com os animais que receberam apenas a MSP3β emulsificada no adjuvante Poly I:C, o que favorece a administração combinada dos três antígenos.

As subclasses IgG1 e IgG2c foram determinadas por ELISA, 14 dias após a terceira imunização. Os resultados foram expressos como a razão entre os títulos desses anticorpos. Como podemos notar na figura 16, houve um equilíbrio entre as quantidades de IgG1 e IgG2c indicando assim um tipo de resposta mista Th1/Th2 para todos os grupos testados.

Figura 16 – Avaliação do perfil de anticorpos IgG1 e IgG2c de camundongos C57BL/6 após imunização com as proteínas recombinantes AMA-1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β administradas isoladamente, ou em combinação, na presença do adjuvante Poly I:C. Os títulos de anticorpos foram determinados por ELISA, utilizando placas cobertas com as proteínas AMA-1 (A), MSP1₁₉ (B) ou MSP3 β (C). Os resultados foram expressos como a razão IgG1/IgG2a $\pm$ erro padrão da média, os quais foram comparados pelo teste de Tukey (one-way ANOVA). ns = não significativo ($P > 0,05$).

Para verificarmos a duração da resposta imunológica gerada pelas imunizações experimentais, os títulos de anticorpos IgG desses animais foram acompanhados por até 6 meses após a terceira imunização. Na figura 17, mostramos os resultados expressos como médias de títulos de IgG ($\log_{10}$).

Figura 17 – Longevidade da resposta de anticorpos IgG de camundongos C57BL/6 após a imunização com as proteínas AMA-1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3β administradas isoladamente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Poly I:C. (A) Títulos de anticorpos IgG dos animais imunizados com as proteínas administradas individualmente até o final do seguimento; (B) Títulos de anticorpos IgG dos animais imunizados com a combinação dos três antígenos até o final do acompanhamento.

Os títulos de anticorpos IgG contra a proteína AMA-1 manteve-se elevado durante o período do acompanhamento, em ambos os grupos testados, ou seja, o que recebeu a proteína administrada isoladamente e o grupo que recebeu a combinação delas, mostrando assim que a resposta foi duradoura. No entanto, a resposta gerada contra a proteína MSP1₁₉-PADRE apresentou uma significativa redução entre os dias 45 e 210, tanto no grupo que recebeu apenas a proteína MSP1₁₉-PADRE como no grupo que recebeu a combinação dos antígenos ($P < 0,001$ em ambos os grupos). Também foi verificado uma redução nos títulos de anticorpos IgG contra a proteína MSP3β no grupo que recebeu a combinação dos antígenos ($P < 0,01$) entre os dias 45 e 210 do acompanhamento, no entanto, o mesmo não foi observado no grupo que recebeu apenas a proteína MSP3β emulsificada no adjuvante Poly I:C, os títulos de anticorpos nesse grupo, manteve-se elevados até o final do acompanhamento.

V. Discussão

A malária é uma doença muito antiga, o agente etiológico dessa patologia foi descoberto em 1880, porém ainda hoje continua sendo um grave problema de saúde pública, com cerca de 40% da população mundial sob o risco de contrair essa doença (revisto por TUTEJA, 2007). As medidas atuais de controle da malária não se mostram suficientemente eficazes, pois apesar da redução no número de casos observado ao longo dos últimos anos, apenas no ano de 2010 foram relatados 216 milhões de casos clínicos e cerca de 655 mil mortes, a maioria delas em crianças menores de 5 anos (*World Malaria Report* - WHO, 2011). Por esses motivos o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra a malária é uma prioridade de saúde pública global (POLHEMUS, 2009).

O ciclo de vida do *Plasmodium spp* é complexo, apresenta diferentes estágios evolutivos, portanto é pouco provável que uma vacina eficaz contra malária seja baseada em um único antígeno. Uma estratégia alternativa de vacinação é, portanto a co-administração de diferentes antígenos da malária. Nesse trabalho, nos propusemos a avaliar a eficiência de uma formulação vacinal contendo a combinação de antígenos presentes tanto na fase hepática de desenvolvimento do parasito (AMA-1) como na fase sanguínea (MSP1₁₉, MSP3 β e AMA-1).

Nos últimos anos, a imunogenicidade das proteínas recombinantes baseadas na MSP1₁₉, MSP3 β e AMA-1 em protocolos de imunização de camundongos, na presença de diferentes formulações de adjuvantes, foram avaliadas pelo nosso grupo. Os resultados obtidos mostraram que todas as proteínas recombinantes foram eficientes em induzir altos títulos de anticorpos em camundongos BALB/c e C57BL/6, quando administradas individualmente (CUNHA et al., 2001; ROSA et al., 2004; ROMAGNOLI, 2011; VICENTIN, 2012).

A expressão das quatro proteínas (MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE, MSP3 β e AMA-1) propostas nesse trabalho foi feita, com sucesso, utilizando protocolos já estabelecidos pelo nosso grupo (CUNHA et al., 2001, ROMAGNOLI, 2011 VICENTIN, 2012). A purificação das mesmas foi realizada utilizando-se duas técnicas cromatográficas distintas, afinidade e troca iônica, com as quais obtivemos amostras com excelentes padrões de pureza, o que foi confirmado tanto no SDS-PAGE como pela análise das proteínas por RP-HPLC, gerando cromatogramas com picos majoritários, confirmando assim que as proteínas poderiam ser utilizadas nos ensaios de imunizações pré-clínicas.

A imunogenicidade das proteínas recombinantes tanto administradas individualmente como em combinação foi testada em duas linhagens de camundongos, os quais possuem diferentes haplótipos de MHC, BALB/c (H-2^d) e C57BL/6 (H-2^b), explorando-se com isso os diferentes padrões de resposta que poderiam surgir ao longo do estudo.

As imunizações pré-clínicas tiveram início com o adjuvante Quil A, que em estudos anteriores mostrou ser eficaz na indução de anticorpos IgG, alcançando, ao final do protocolo de imunização, títulos semelhantes aos obtidos com o adjuvante de Freund (ROSA et al., 2004; ROMAGNOLI, 2011; VICENTIN, 2012), apresentando a vantagem de ser liberado para uso veterinário.

Os camundongos BALB/c imunizados com as proteínas MSP1₁₉, MSP3 β e AMA-1 emulsificadas no adjuvante Quil A produziram expressivos títulos de anticorpos IgG. A combinação dos três antígenos também foi eficiente na produção de anticorpos contra as proteínas AMA-1 e MSP3 β , e não foi verificada redução na resposta gerada contra essas proteínas nesse grupo quando comparado com os grupos que receberam as proteínas administradas individualmente. No entanto, foi observado uma redução na resposta de anticorpos IgG contra a proteína MSP1₁₉ no grupo que recebeu a mistura de antígenos.

Esse mesmo protocolo de vacinação foi testado na linhagem C57BL/6, com a inclusão de dois novos grupos experimentais, o que recebeu a proteína MSP1₁₉-PADRE emulsificada no adjuvante Quil A e o que recebeu a combinação da AMA-1+ MSP1₁₉-PADRE+MSP3 β emulsificadas no adjuvante Quil A. Resolvemos incluir a MSP1₁₉-PADRE nesse grupo experimental, pois essa linhagem de camundongos desenvolve uma forte resposta de células T contra o epítipo PADRE, que é um epítipo universal para células T (CUNHA et al., 2001; ROSA et al., 2004). Altos títulos de anticorpos foram produzidos contra todas as proteínas testadas, e interessante, não foi observado redução na produção de anticorpos IgG, nos grupos que receberam a combinação dos antígenos, contra todas as proteínas testadas. Não foi observado diferença estatisticamente significativa na produção de anticorpos IgG entre os grupos que receberam a MSP1₁₉ e a MSP1₁₉-PADRE, fato que já havia sido observado em estudos anteriores (CUNHA et al., 2001; ROSA et al., 2004). Porém, com o intuito de se promover uma maior estimulação da resposta

de células T, os próximos experimentos foram conduzidos utilizando-se a proteína MSP1₁₉ fusionada ao epítopo PADRE.

A imunogenicidade dessas proteínas assim como da combinação das mesmas também foi avaliada utilizando-se o adjuvante Poly I:C, visando futuros testes em primatas não humanos e testes em humanos. Esse adjuvante foi testado anteriormente em uma vacina contra o estágio pré-eritrocítico da malária, utilizando-se a proteína CSP em primatas não humanos, e foi visto que o Poly I:C promoveu uma potente indução de anticorpos e resposta Th1 contra essa proteína, mostrando ser uma importante alternativa para o desenvolvimento de novas formulações vacinais (TEWARI et al., 2010), uma vez que o número de adjuvantes que podem ser utilizados no homem é muito restrito.

Os camundongos BALB/c imunizados com as proteínas MSP1₁₉-PADRE, MSP3β e AMA-1, emulsificadas no adjuvante Poly I:C, desenvolveram expressivos títulos de anticorpos IgG, porém mais baixos do que os observados com o adjuvante Quil A. O grupo que recebeu a combinação dos três antígenos apresentou títulos de anticorpos anti-MSP1₁₉ e anti-AMA-1 mais baixos do que os grupos que receberam essas proteínas administradas individualmente ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente). Não foi observado diferença estatisticamente significativa nos títulos anti-MSP3β entre os grupos que receberam apenas essa proteína ou a mistura de antígenos.

Esse mesmo protocolo de vacinação foi conduzido em camundongos C57BL/6, onde foram observados expressivos títulos de anticorpos contra as três proteínas testadas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os títulos de anticorpos IgG dos grupos que receberam as proteínas MSP1₁₉-PADRE e AMA-1 com os títulos anti-MSP1₁₉ e anti-AMA-1 do grupo que recebeu a combinação das mesmas. Interessantemente, houve um aumento da resposta de anticorpos contra a proteína MSP3β no grupo que recebeu a combinação dos antígenos quando comparado com a resposta do grupo que recebeu apenas a MSP3β emulsificada com o adjuvante Poly I:C, sugerindo assim que a combinação dos antígenos promoveu uma potencialização da resposta de anticorpos IgG contra essa proteína.

Os protocolos de imunizações experimentais testados induziram um perfil de resposta mista Th1/Th2, uma vez que, em todos os grupos foi visto uma baixa razão

entre os títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a, para os animais BALB/c e entre os títulos de anticorpos IgG1 e IgG2c, para os camundongos C57BL/6. A maior razão encontrada foi de 32 para o grupo de animais BALB/c imunizados com a proteína AMA-1 emulsificada no adjuvante Quil A e para o grupo de animais C57BL/6 que recebeu a MSP1₁₉-PADRE também com o adjuvante Quil A.

Para verificarmos se a resposta gerada pelas imunizações experimentais era duradoura os títulos de anticorpos IgG desses animais foram acompanhados por 6 meses depois da última imunização. A resposta gerada nos camundongos BALB/c imunizados com as proteínas MSP1₁₉, MSP3 β e AMA-1 administradas individualmente ou em combinação, emulsificadas no adjuvante Quil A, foi duradoura. Observamos uma diminuição nos títulos de anticorpos IgG entre os dias 45, ou seja, logo após a administração da terceira dose da vacina e o dia 210, ou seja, 6 meses depois da última dose da vacina, apenas nos grupos imunizados com as proteínas AMA-1 e MSP3 β quando administradas individualmente ($P < 0,05$, em ambos os casos). Surpreendentemente, o grupo que recebeu os três antígenos não apresentou essa redução nos títulos de anticorpos IgG com o passar do tempo, ressaltando assim uma importante vantagem na combinação dos antígenos. Os títulos gerados contra a proteína MSP1₁₉ não apresentou redução, durante os 6 meses do acompanhamento, em ambos os grupos, ou seja, o que recebeu a proteína administrada individualmente e o que recebeu a combinação.

Também foi observada uma resposta duradoura de anticorpos IgG nos grupos de camundongos C57BL/6 imunizados com as proteínas MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE, MSP3 β e AMA-1 ou a combinação das mesmas, emulsificadas no adjuvante Quil A. Houve uma diminuição da resposta apenas contra a proteína AMA-1 no grupo imunizado com essa proteína administrada individualmente e no grupo que recebeu a combinação dos antígenos composta pela MSP1₁₉-PADRE ($P < 0,01$, em ambos os grupos), quando comparamos os títulos de anticorpos obtidos no dia 45 e no dia 210. Os demais grupos não apresentaram redução da resposta de anticorpos IgG durante os 6 meses do acompanhamento.

A longevidade da resposta contra a proteína MSP1₁₉ já havia sido testada anteriormente, em grupos de camundongos C57BL/6 imunizados duas vezes com a proteína MSP1₁₉-PADRE emulsificada nos adjuvantes CFA/IFA, Quil A, MPL/TDM, MPL/TDM/CWS, Alum+CpG ODN 1826 e TiterMax Gold, esses animais foram

acompanhados por 50 semanas depois da primeira imunização, foi observado que a resposta de anticorpos IgG foi extremamente longa em todas as formulações de adjuvantes testadas, confirmando assim o resultado obtido em nosso grupo experimental (ROSA et al., 2004).

A resposta de anticorpos IgG dos camundongos BALB/c imunizados com as proteínas AMA-1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β , emulsificadas no adjuvante Poly I:C, foi duradoura, não havendo redução estatisticamente significativa entre os títulos de anticorpos IgG obtidos logo após a terceira imunização (dia 45) com os títulos obtidos passados 6 meses da terceira imunização (dia 210), em todos os grupos testados.

Já os títulos dos camundongos C57BL/6 imunizados com este mesmo protocolo de vacinação apresentaram uma redução estatisticamente significativa, contra a proteína MSP1₁₉, tanto no grupo que recebeu a proteína MSP1₁₉-PADRE administrada individualmente como no grupo que recebeu a combinação dos antígenos ($P < 0,001$). Também foi observada uma redução nos títulos de anticorpos contra a proteína MSP3 β ($P < 0,01$) no grupo que recebeu a mistura dos antígenos, o mesmo não foi observado no grupo que recebeu a proteína administrada isoladamente. Os títulos de anticorpos IgG contra a proteína AMA-1 não apresentaram redução em ambos os grupos testados.

Em todos os grupos testados, podemos observar que, no geral, a resposta induzida pelas imunizações experimentais foi duradoura. Fato muito importante quando se pensa no desenvolvimento de uma vacina contra a malária que é uma doença que atinge principalmente a população de países subdesenvolvidos onde muitas vezes as pessoas moram em locais de difícil acesso, como é o caso, por exemplo, da população que mora na região da Bacia Amazônica, o que tornaria pouco eficaz uma vacina que necessitasse de muitas doses.

Poucos estudos de combinação de diferentes antígenos foram conduzidos até o momento. PICHYANGKUL e colaboradores, em 2008, imunizou macacos Rhesus com a vacina RTS,S/AS01B e o antígeno 1 do estágio hepático (LSA1) emulsificado nesse mesmo adjuvante. Foi observado que não houve interferência significativa na resposta imune gerada contra essas duas proteínas no grupo que recebeu a combinação dos antígenos, vale ressaltar apenas que as proteínas foram injetadas em diferentes locais de administração.

Outro estudo publicado por esse mesmo grupo no ano de 2009 avaliou a combinação dos antígenos AMA-1, MSP1₄₂ e a vacina RTS,S/ASO2A, em macacos *Rhesus*. Foi observada uma redução da resposta de anticorpos contra a proteína AMA-1 no grupo que recebeu a combinação dos três antígenos tanto quando administrados em uma única formulação, ou seja, no mesmo local de administração como quando administrados em diferentes locais (PICHYANGKUL et al., 2009).

Esses dados ressaltam a importância da condução desses ensaios pré-clínicos para verificarmos se a combinação de diferentes antígenos causa interferência ou não na resposta imunológica gerada contra cada uma das proteínas testadas, uma vez que é possível observar padrões de resposta distintos com a utilização de diferentes estratégias de combinação.

Para um efetivo controle da malária, incluindo o desenvolvimento de uma vacina mais eficaz, estudos da diversidade genética do *Plasmodium spp* mostram-se cada vez mais necessários.

PASAY e colaboradores em 1995 compararam a sequência de aminoácidos da região C-terminal da MSP-1 (MSP1₁₉) de 20 isolados da Ásia. Esse estudo mostrou que a *PvMSP1₁₉* possui apenas uma substituição de aminoácidos. Sendo que, essa substituição não foi encontrada em isolados brasileiros (SOARES et al., 1999). Esses dados suportam sua utilização no desenvolvimento de uma vacina contra a malária *vivax*.

Por outro lado, a MSP3 β possui uma alta taxa de polimorfismo. Um estudo conduzido com 15 isolados provenientes da Ásia, América do Sul e da região do Pacífico mostrou que essa alta taxa de polimorfismo se dá principalmente na região central rica em alanina, sendo a região C-terminal mais conservada entre os isolados. O nível de divergência entre os isolados é tão elevado que a taxa de identidade de aminoácidos chega a apenas 33%. Diferentes tamanhos no gene da MSP3 β foram observados, isso devido a inserções ou deleções de grandes sequências de nucleotídeos e também pela presença de numerosos sítios de mutações de nucleotídeos. Apesar dessas alterações algumas propriedades físicas da proteína são mantidas, como sua habilidade em formar sua estrutura terciária em “coiled-coil” (RAYNER et al., 2004).

No que se refere à AMA-1, um estudo conduzido pelo nosso grupo, comparou a sequência de nucleotídeos do domínio I dessa proteína de 20 isolados da região Norte do Brasil e concluiu que o gene *pvama-1* apresenta limitado polimorfismo. A sequência de aminoácidos dessas amostras foram comparadas entre si, e foi visto uma identidade de aminoácidos maior que 93%. Os isolados brasileiros também foram comparados com a cepa Salvador I, proveniente da América Central, e com a cepa PH-84, proveniente da Ásia, a identidade de aminoácidos foi de 92,2% e 93%, respectivamente, concluindo-se com isso que a sequência do gene *pvama-1* apresenta uma variação limitada (RODRIGUES et al., 2005).

GRYNBERG e colaboradores (2008) conduziram um estudo com 105 sequências do gene *pvama-1* de seis estados brasileiros, com o intuito de avaliar a diversidade genética existente no gene dessa proteína e comparar com as sequências, já conhecidos, do Velho Mundo. Este trabalho focou-se do domínio I da proteína, sabidamente mais polimórfico. Foi visto que, os isolados brasileiros apresentaram 28 sítios de polimorfismo de nucleotídeos, levando a 26 substituições de aminoácidos. Pode-se então concluir que os isolados brasileiros apresentam reduzido polimorfismo quando comparado com as sequências dos isolados da Ásia e Oceania.

Uma grande limitação no estudo de vacinas contra o *P. vivax* é a realização de testes funcionais, extremamente necessários para se averiguar a eficácia da formulação em teste. Atualmente, esses ensaios estão restritos a poucos laboratórios de pesquisa, devido à complexidade da realização dos mesmos, uma vez que o *P. vivax* infecta preferencialmente reticulócitos, que representa uma pequena parcela da população presente no sangue periférico, e também devido à baixa carga parasitária encontrada no sangue dos pacientes infectados pelo *P. vivax*.

RUSSEL e colaboradores (2011) conseguiram superar esses obstáculos, e desenvolveram um ensaio de reinvasão “ex vivo”, utilizando-se reticulócitos de cordão umbilical e esquizontes maduros de *P. vivax* concentrados de isolados clínicos. A confiabilidade deste ensaio foi confirmada utilizando-se um amplo painel de isolados recém coletados de pacientes da Tailândia. O pesquisador Dr. Fábio Costa da Universidade Estadual de Campinas em parceria com o pesquisador Bruce Russel está implementando esse ensaio na região Amazônica. Após a consolidação

total deste ensaio no Brasil é de interesse do grupo testar os soros policlonais obtidos nos camundongos imunizados neste trabalho, verificando assim a funcionabilidade dos mesmos.

Nossos dados, em conjunto, mostram que a vacinação com a combinação de diferentes antígenos pode ser uma estratégia alternativa para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária, pois mesmo na linhagem de camundongos BALB/c que apresentou uma diminuição na resposta de anticorpos IgG contra a AMA-1 no grupo imunizado com Poly I:C e contra a proteína MSP1₁₉ nos grupos imunizados com Quil A ou Poly I:C houve o desenvolvimento de anticorpos contra todas as proteínas presentes na formulação vacinal. Além disso, a resposta de anticorpos estimulada pelas imunizações experimentais foi duradoura, no geral, os títulos de anticorpos permaneceram elevados por até 6 meses depois da terceira dose da vacina, o que representa, em média, metade da vida dos camundongos, cumprindo assim outro importante requisito quando se pensa no desenvolvimento de uma vacina.

VI. Conclusões

1. A imunização de camundongos com a combinação das proteínas recombinantes propostas neste estudo (MSP1₁₉/MSP1₁₉-PADRE, MSP3 β e AMA-1) foi eficiente na indução de altos títulos de anticorpos IgG, na presença de ambos os adjuvantes testados;
2. Em geral, a combinação dos três antígenos não interferiu na resposta de anticorpos induzida pelos epítomos individuais, exceto em camundongos BALB/c, nos quais certas diferenças foram observadas;
3. As imunizações com os antígenos emulsificados em Quil A foi capaz de induzir títulos de anticorpos mais altos do que na presença do adjuvante Poly I:C;
4. Os títulos de anticorpos IgG, no geral, permaneceram elevados por até seis meses depois da terceira imunização, mostrando assim que a resposta antígeno-específica gerada nos animais é duradoura.

VII. Referências Bibliográficas

ALEXANDRE, M.A.; FERREIRA, C.O.; SIQUEIRA, A.M.; MAGALHÃES, B.L.; MOURÃO, M.P.G.; LACERDA, M.V.; ALECRIM, M.G.C. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. **Emerg. Infect. Dis.** v. 16, n. 10, p. 1611-1614, 2010.

ANDERS, R. F.; CREWETHER, P. E.; EDWARDS, S.; MARGETTS, M.; MATTHEW, M.L.; POLLOCK, B.; PYE, D. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. **Vaccine**. v. 16, n. 2-3, p. 240-247, 1998.

ARÉVALO-HERRERA, M.; CHITNIS, C.; HERRERA, S. Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. **Hum. Vaccin.** v. 6, n. 1, p. 124-132, 2010.

BARGIERI, D. Y.; ROSA, D. S.; BRAGA, C. J. M.; CARVALHO, B. O.; COSTA, F. T. M.; ESPÍNDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; SOARES, I. S.; FERREIRA, L. C. S.; RODRIGUES, M. M.; New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella* Typhimurium Flic flagellin. **Vaccine**. v. 26, n. 48, p. 6132-6142, 2008.

BARRERO, C. A.; DELGADO, G.; SIERRA, A. Y.; SILVA, Y.; PARRA-LOPEZ, C.; PATARROYO, M. A. Gamma interferon levels and antibody production induced by two PvMSP-1 recombinant polypeptides are associated with protective immunity against *P. vivax* in Aotus monkeys. **Vaccine**. v. 23, n. 31, p. 4048-4053, 2005.

BAUM, J.; COWMAN, A.F. Revealing a Parasite's Invasive Trick. **Science**. v. 333, n. 6041, p. 410-411, 2011.

BOUILLET, L.É.; DIAS, M. O.; DORIGO, N. A.; MOURA, A. D.; RUSSELL, B.; NOSTEN, F.; RENIA, L.; BRAGA, E. M.; GAZZINELLI, R. T.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S.; BRUNA-ROMERO, O. Long-term humoral and cellular immune responses elicited by a heterologous *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 protein prime/adenovirus boost immunization protocol. **Infect. Immun.** v. 79, n. 9, p. 3642-3652, 2011.

BOYLE, M. J.; WILSON, D. W.; RICHARDS, J. S.; RIGLAR, D. T.; TETTEH, K. K.; CONWAY, D. J.; RALPH, S. A.; BAUM, J.; BEESON, J. G.; Isolation of viable *Plasmodium falciparum* merozoites to define erythrocyte invasion events and advance vaccine and drug development. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 107, n. 32, p. 14378-14383, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**, Secretaria de Vigilância em Saúde. 7. ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Ações do SUS ajudam a reduzir casos de malária. Disponível em:< <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3945/162/acoes-do-sus-ajudam-a-reduzir-casos-de-malaria.html>>. Acesso em 05 mar. 2012.

BRUDER, J. T.; STEFANIAK, M. E.; PATTERSON, N. B.; CHEN, P.; KONOVALOVA, S.; LIMBACH, K.; CAMPO, J. J.; ETTYREDDY, D.; LI, S.; DUBOVSKY, F.; RICHIE, T. L.; KING, C. R.; LONG, C. A.; DOOLAN, D. L.

Adenovectors induce functional antibodies capable of potent inhibition of blood stage malaria parasite growth. **Vaccine**. v. 28, n. 18, p. 3201-3210, 2010.

CARVALHO, B.O.; LOPES, S.C.; NOGUEIRA, P.A.; ORLANDI, P.P.; BARGIERI, D.Y.; BLANCO, Y.C.; MAMONI, R.; LEITE, J.A.; RODRIGUES, M.M.; SOARES, I.S.; OLIVEIRA, T.R.; WUNDERLICH, G.; LACERDA, M.V.; DEL PORTILLO, H.A.; ARAÚJO, M.O.; RUSSELL, B.; SUWANARUSK, R.; SNOUNOU, G.; RÉNIA, L.; COSTA, F.T.; On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erythrocytes. **J. Infect. Dis.** v. 202, n. 4, p. 638-647, 2010.

Center for Disease Control and Prevention – CDC. **Emerging. Infectious. Diseases**. Vol. 12, No. 12, p. 1906, dezembro de 2006. Disponível em < <http://www.cdc.gov/NCIDOD/EID/vol12no12/pdfs/vol12no12.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2010

Center for Disease Control and Prevention – CDC. **Malária**. Disponível em < <http://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>>. Acesso em: 25 set. 2010

Center for Disease Control and Prevention – CDC. **Malária**. Disponível em < <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm>>. Acesso em: 28 dez. 2010

CHANG, S. P.; CASE, S. E.; GOSNELL, W. L.; HASHIMOTO, A.; KRAMER, K. J.; TAM, L. Q.; HASHIRO, C.Q.; NIKAIDO, C. M.; GIBSON, H. L.; LEE-NG, C. T.; BARR, P. J.; YOKOTA, B. T.; HUT, G. S.; A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 protects *Aotus* monkeys against malaria. **Infect. Immun.** v. 64, n. 1, p. 253–261, 1996.

COGSWELL, F. B. The hypnozoite and relapse in primate malaria. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 5, n. 1, p. 26–35, 1992.

COLLINS, W. E.; PYE, D.; CREWETHER, P. E.; VANDENBERG, K.L.; GALLAND, G.G.; SULZER, A. J.; KEMP, D.J.; EDWARDS, S.J.; COPPEL, R. L.; SULLIVAN, J. S.; MORRIS, C. L.; ANDERS, R. F. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 51, n. 6, p. 711-719, 1994.

COWMAN, A. F.; CRAB, B.S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. **Cell. Press.** v. 124, n. 4, p. 755–766, 2006.

COX, F.E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. **Parasit. Vectors.** v. 3, n. 1, p. 5, 2010.

CREWETHER, P. E.; MATTHEW, M. L.; FLEGG, R. H.; ANDERS, R. F. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. **Infect. Immun.** v. 64, n. 8, p. 3310-3317, 1996.

CUNHA, M. G. Resposta imune humana contra proteínas recombinantes correspondentes a antígenos de superfície do merozoíta de *Plasmodium vivax*: ênfase ao desenvolvimento de uma vacina contra malária. **Tese de doutorado**, departamento de Imunologia, Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2001.

CUNHA, M.G.; RODRIGUES, M.M.; SOARES, I.S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine**. v. 20, n. 3-4, p. 385-396, 2001.

DALY, T. M.; LONG, C. A. A recombinant 15-kilodalton carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii yoelii* 17XL merozoite surface protein 1 induces a protective immune response in mice. **Infect. Immun.** v. 61, n. 6, p. 2462-2467, 1993.

DARKO, C. A.; ANGOV, E.; COLLINS, W. E.; BERGMANN-LEITNER, E. S.; GIROUARD, A. S.; HITT, S. L.; MCBRIDE, J. S.; DIGGS, C. L.; HOLDER, A. A.; LONG, C. A.; BARNWELL, J.W.; LYON, J. A. The clinical-grade 42-kilodalton fragment of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium falciparum* strain FVO expressed in *Escherichia coli* protects *Aotus nancymai* against challenge with homologous erythrocytic-stage parasites. **Infect. Immun.** v. 73, n. 1, p. 287-297, 2005.

DEANS, J. A.; KNIGHT, A. M.; JEAN, W. C.; WATERS, A. P.; COHEN, S.; MITCHELL, G. H. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor; invariant; *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. **Parasite Immunol.** v. 10, n. 5, p. 535-552, 1988.

DEL PORTILLO, H.A.; LONGACRE, S.; KHOURI, E.; DAVID, P.H. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. v. 88, n. 9, p. 4030-4034, 1991.

DEVI, Y. S.; MUKHERJEE, P.; YAZDANI, S. S.; SHAKRI, A. R.; MAZUMDAR, S.; PANDEY, S.; CHITNIS, C. E.; CHAUHAN, V. S. Immunogenicity of *Plasmodium vivax* combination subunit vaccine formulated with human compatible adjuvants in mice. **Vaccine**. v. 25, n. 28, p. 5166-5174, 2007.

DRAPER, S. J.; GOODMAN, A. L.; BISWAS, S.; FORBES, E. K.; MOORE, A.C.; GILBERT, S. C.; HILL, A. V. Recombinant viral vaccines expressing merozoite surface protein-1 induce antibody- and T cell-mediated multistage protection against malaria. **Cell. Host. Microbe**. v. 5, n. 1, p. 95-105, 2009.

DRAPER, S. J.; MOORE, A. C.; GOODMAN, A. L.; LONG, C. A.; HOLDER, A. A.; GILBERT, S. C.; HILL, F.; HILL, A. V. Effective induction of high-titer antibodies by viral vector vaccines. **Nat. Med.** v. 14, n. 8, p. 819-821, 2008.

DRUILHE, P.; SPERTINI, F.; SOESOE, D.; CORRADIN, G.; MEJIA, P.; SINGH, S.; AUDRAN, R.; BOUZIDI, A.; OEUVRAY, C.; ROUSSILHON, C. A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill *Plasmodium falciparum*. **PLoS Med.** v. 2, n. 11, e344, p. 1135-1144, 2005.

DUTTA, S.; LALITHA, P.V.; WARE, L. A.; BARBOSA, A.; MOCH, J. K.; VASSELL, M. A.; FILETA, B. B.; KITOV, S.; KOLODNY, N.; HEPNER, D. G.; HAYNES, J. D.; LANAR, D. E. Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 expressed in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** v. 70, n. 6, p. 3101-3110, 2002.

DUTTA, S.; HAYNES, J. D.; MOCH, J. K.; BARBOSA, A.; LANAR, D. E. Invasion-inhibitory antibodies inhibit proteolytic processing of apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 100, n. 21, p. 12295-12300, 2003.

DUTTA, S.; KAUSHAL, D.C.; WARE, L. A.; PURI, S. K.; KAUSHAL, N. A.; NARULA, A.; UPADHYAYA, D. S.; LANAR, D. E. Merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* induces a protective response against *Plasmodium cynomolgi* challenge in rhesus monkeys. **Infect. Immun.** v. 73, n. 9, p. 5936-5944, 2005.

DUTTA, S.; SULLIVAN, J. S.; GRADY, K. K.; HAYNES, J. D.; KOMISAR, J.; BATCHELOR, A. H.; SOISSON, L.; DIGGS, C. L.; HEPPNER, D. G.; LANAR, D. E.; COLLINS, W. E.; BARNWELL, J. W. High antibody titer against apical membrane antigen-1 is required to protect against malaria in the Aotus model. **PLoS One.** v. 4, n. 12, e8138, 2009.

GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax*: Who cares? **Malar. J.** v. 11, n. 7, Suppl 1:S9, 2008.

GALINSKI, M. R.; CORREDOR-MEDINA, C.; POVOA, M.; CROSBY, J.; INGRAVALLO, P.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in an alanine-rich central domain. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 101, n. 1-2, p. 131-147, 1999.

GALINSKI, M. R.; INGRAVALLO, P.; CORREDOR-MEDINA, C.; AL-KHEDERY, B.; POVOA, M.; BARNWELL, J.W. *Plasmodium vivax* merozoite surface proteins-3beta and-3gamma share structural similarities with *P. Vivax* merozoite surface protein-3alpha and define a new gene family. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 115, n. 1, p. 41-53, 2001.

GAUR, D.; MAYER, D.C.; MILLER, L.H. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **Int. J. Parasitol.** v. 34, n. 13-14, p. 1413-1429, 2004.

GENTIL, F. Imunizações pré-clínicas contra malária utilizando uma proteína recombinante baseada no domínio II do antígeno 1 de membrana apical de *Plasmodium vivax*. Tese de mestrado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Farmácia- Área de Análises Clínicas, 2010.

GENTIL, F.; BARGIERI, D.Y.; LEITE, J.Á.; FRANÇOSO, K.S.; PATRICIO, M.B.M.; ESPINDOLA, N.M.; VAZ, A.J.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; RODRIGUES, M.M.; COSTA F.T.; SOARES, I.S. A recombinant vaccine based on domain II of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 induces high antibody titres in mice. **Vaccine.** v. 28, n. 38, p. 6183-6190, 2010.

GOOD, F.M.; DOOLAN, D.L. Malaria vaccine design: immunological considerations. **Immunity.** v. 33, n. 4, p. 555-566, 2010.

GREENWOOD, B.M.; FIDOCK, D.A.; KYLE, D.E.; KAPPE, S.H.; ALONSO, P.L.; COLLINS, F.H.; DUFFY, P.E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **J. Clin. Invest.** v. 118, n.4, p. 1266-1276, 2008

GREENWOOD, B.M.; TARGETT, G.A.T. Malaria vaccines and the new malaria agenda. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 17, n. 11, p. 1600–1607, 2011.

GRYNBERG, P.; FONTES, C. J.; HUGHES, A. L.; BRAGA, E. M. Polymorphism at the apical membrane antigen 1 locus reflects the world population history of *Plasmodium vivax*. **BMC. Evol. Biol.** v. 8, n.123, 2008.

GUEIRARD, P.; TAVARES, J.; THIBERGE, S.; BERNEX, F.; ISHINO, T.; MILON, G.; FAYARD, B. F.; JANSE, C.J.; MÉNARD, R.; AMINO, R. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 107, n. 43, p. 18640-18645, 2010.

HAY, S. I.; GUERRA, C. A.; TATEM, A. J.; NOOR, A. M.; SNOW, R. W. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. **Lancet. Infect. Dis.** v. 4, n. 6, p. 327–336, 2004.

HEHL, A.B.; LEKUTIS, C.; GRIGG, M.E.; BRADLEY, P.J.; DUBREMETZ, J.F.; ORTEGABARRIA, E.; BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii* homologue of *Plasmodium* apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. **Infect. Immun.** v. 68, n. 12, p. 7078-7086, 2000.

HERRERA, M.A.; CHITNIS, C.; HERRERA, S., Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. **Hum. Vaccin.** v. 6, n. 1, p. 124-132, 2010.

HERRERA, S.; CORRADIN, G.; ARÉVALO-HERRERA, M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. **Trends Parasitol.** v. 23, n. 3, p. 122-128, 2007.

HIRUNPETCHARAT, C.; STANISIC, D.; LIU, X. Q.; VADOLAS, J.; STRUGNELL, R. A.; LEE, R.; MILLER, L. H.; KASLOW, D. C.; GOOD, M. F. Intranasal immunization with yeast-expressed 19 kD carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein-1 (yMSP119) induces protective immunity to blood stage malaria infection in mice. **Parasite Immunol.** v. 20, n. 9, p. 413-420, 1998.

HIRUNPETCHARAT, C.; VUKOVIC, P.; LIU, X. Q.; KASLOW, D. C.; MILLER, L. H.; GOOD, M. F. Absolute requirement for an active immune response involving B cells and Th cells in immunity to *Plasmodium yoelii* passively acquired with antibodies to the 19-kDa carboxyl-terminal fragment of merozoite surface protein-1. **J. Immunol.** v. 162, n. 12, p. 7309-7314, 1999.

HIRUNPETCHARAT, C.; MAHAKUNKIJCHAROEN, Y.; JEAMWATTANALERT, P.; KITTIGUL, L.; MAHANNOP, P.; PICHYANGKUL, S. A single injection of 19 kda carboxy-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 1 (PyMSP1(19)) formulated with Montanide ISA and CpG ODN induces protective immune response in mice. **Asian. Pac. J. Allergy. Immunol.** v. 29, n. 3, p. 252-259, 2011.

HODDER, A. N.; CREWETHER, P. E.; ANDERS, R. F. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. **Infect. Immun.** v. 69, n. 5, p. 3286-3294, 2001.

HODDER, A.N.; CREWETHER, P.E.; MATTHEW, L.S.M.; REIDI, G.E.; MORITZI, R.L.; SIMPSON, R.J.; ANDERS, R.F. The Disulfide Bond Structure of *Plasmodium* Apical Membrane Antigen-1. **J. Biol. Chem.** v. 271, n. 46, p. 29446-29752, 1996.

HOFFMAN, S.L.; GOH, L.M.L.; LUKE, T.C.; SCHNEIDER, I.; LE, T.P.; DOOLAN, D.L.; SACCI, J.; DE LA VEGA, P.; DOWLER, M.; PAUL, C.; GORDON, D.M.; STOUTE, J.A.; CHURCH, L.W.P.; SEDEGAH, M.; HEPPNER, D.G.; BALLOU, W.R.; RICHIE, T.L. Protection of Humans against Malaria by Immunization with Radiation-Attenuated *Plasmodium falciparum* Sporozoites. **J. Infect. Dis.** v. 185, n. 8, p. 1155-1164, 2002.

HOLDER, A. A.; FREEMAN, R. R. Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens. **Nature.** v.294, n. 5839, p.361-364, 1981.

HOLDER, A. A.; The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria. **Parasitology.** v. 136, n. 12, p. 1445-1456, 2009.

HUAMAN, M. C.; MARTIN, L. B.; MALKIN, E.; NARUM, D. L.; MILLER, L. H.; MAHANTY, S.; LONG, C. A. Ex vivo cytokine and memory T cell responses to the 42-kDa fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in vaccinated volunteers. **J. Immunol.** v. 180, n. 3, p. 1451-1461, 2008.

HULDEN, L.; HULDEN, L. Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. **Malar. J.** v.10, p. 90, 2011.

JEAMWATTANALERT, P.; MAHAKUNKIJCHAROEN, Y.; KITTIGUL, L.; MAHANNOP, P.; PICHYANGKUL, S.; HIRUNPETCHARAT, C. Long-lasting protective immune response to the 19-kilodalton carboxy-terminal fragment of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein 1 in mice. **Clin. Vaccine. Immunol.** v. 14, n. 4, p. 342-347, 2007.

JIMENEZ, M. C. Estudos biofísicos, estruturais e imunológicos de proteínas recombinantes correspondentes a antígenos de superfície de merozoítas de *Plasmodium vivax*. **Tese de doutorado**, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Farmácia- Área de Análises Clínicas, 2007.

JIMENEZ, M. C.; RAMOS, C. H. I.; BARBOSA, J. A. R. G.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; RODRIGUES, M.; SOARES, I. S. Biophysical characterization of the recombinant merozoite surface protein-3 of *Plasmodium vivax*. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1780, n. 7-8, p. 983-988, 2008.

KENNEDY, M. C.; WANG, J.; ZHANG, Y.; MILES, A. P.; CHITSAZ, F.; SAUL, A.; LONG, C. A.; MILLER, L.H.; STOWERS, A. W. In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. **Infect. Immun.** v. 70, n. 12, p. 6948-6960, 2002.

KIM, H. J.; JUNG, B. K.; LEE, J. J.; PYO, K. H.; KIM, T. Y.; CHOI, B. I.; KIM, T. W.; HISAEDA, H.; HIMENO, K.; SHIN, E. H.; CHAI, J. Y. CD8 T-cell activation in mice

injected with a plasmid DNA vaccine encoding AMA-1 of the reemerging Korean *Plasmodium vivax*. **Korean J. Parasitol.** v. 49, n. 1, p. 85-90, 2011.

KOCKEN, C. H.; DUBBELD, M. A.; VAN, D. E. R.; WEL, A.; PRONK, J. T.; WATERS, A.P.; LANGERMANS, J. A.; THOMAS, A.W. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. **Infect. Immun.** v. 67, n. 1, p. 43-49, 1999.

KOCKEN, C. H.; WITHERS-MARTINEZ, C.; DUBBELD, M. A.; VAN, D. E. R.; WEL, A.; HACKET, T.; VALDERRAMA, A.; BLACKMAN, M.J.; THOMAS, A. W. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. **Infect. Immun.** v. 70, n. 8, p. 4471-4476, 2002.

KUSI, K. A.; REMARQUE, E. J.; RIASAT, V.; WALRAVEN, V.; THOMAS, A. W.; FABER, B. W.; KOCKEN, C. H. Safety and immunogenicity of multi-antigen AMA1-based vaccines formulated with CoVaccine HT™ and Montanide ISA 51 in rhesus macaques. **Malar. J.** v. 10, n.182, 2011.

LALITHA, P. V.; WARE, L. A.; BARBOSA, A.; DUTTA, S.; MOCH, J. K.; HAYNES, J. D.; FILETA, B. B.; WHITE, C. E.; LANAR, D. E. Production of the subdomains of the *Plasmodium falciparum* Apical Membrane Antigen 1 ectodomain and analysis of the immune response. **Infect. Immun.** v. 72, n. 8, p. 4464-4470, 2004.

LALITHA, P. V.; BISWAS, S.; PILLAI, C. R.; SAXENA, R. K. Immunogenicity of a recombinant malaria vaccine candidate, domain I+II of AMA-1 ectodomain, from Indian *P. falciparum* alleles. **Vaccine.** v. 26, n. 35, p. 4526-4535, 2008.

LANGERMANS, J. A.; HENSMANN, M.; VAN GIJLSWIJK, M.; ZHANG, D.; PAN, W.; GIERSSING, B. K.; LOCKE, E.; DUBOVSK, F.; WITTES, J.; THOMAS, A. W. Preclinical evaluation of a chimeric malaria vaccine candidate in Montanide ISA 720: immunogenicity and safety in rhesus macaques. **Hum. Vaccin.** v. 2, n. 5, p. 222-226, 2006.

LEVITUS, G.; DEL PORTILLO, H. A. Advances toward the development of an asexual blood stage MSP-1 vaccine of *Plasmodium vivax*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 89, suppl. 2, p. 81-84, 1994.

Life Cycle of Plasmodium. Disponível em: <http://www.mcwhealthcare.com/malaria_drugs_medicines/life_cycle_of_plasmodium.htm> Acesso em 13 dezembro 2011.

Life cycle of the malaria parasite. Disponível em: <<http://www.malariavaccine.org/malvac-lifecycle.php>> Acesso em 02 dezembro 2011.

LING, I. T.; OGUN, S. A.; HOLDER, A. A. Immunization against malaria with a recombinant protein. **Parasite Immunol.** v. 16, n. 2, p. 63-67, 1994.

MALKIN, E. M.; LONG, C. A.; STOWERS, A.; ZOU, L.; SINGH, S.; MACDONALD, N. J.; NARUM, D. L.; MILES, A. P.; ORCUTT, A. C; MURATOVA, O., MORETZ, S.

E.; ZHOU, H.; DIOUF, A.; FAY, M.; TIERNEY, E.; LEESE, P.; MAHANTY, S.; MILLER, L.H.; SAUL, A.; MARTIN, L. B. Phase 1 Study of Two Merozoite Surface Protein 1 (MSP1₄₂) Vaccines for *Plasmodium falciparum* Malaria. **PLoS Clin. Trials**. v. 2, n. 4, e12, 2007.

MENDIS, K.; SINA, B. J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 64, suppl. 1-2, p. 97-106, 2001.

MILLER, L. H.; HOFFMAN, S. L. Research toward vaccines against malaria. **Nat. Med.** v. 4, suppl. 5, p. 520-524, 1998.

MORAIS, C. G.; SOARES, I. S.; CARVALHO, L. H.; FONTES, C. J.; KRETTLI, A. U.; BRAGA, E. M. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. **Hyg. Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 75, n. 4, p. 582-587, 2006.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J.K.; CARLTON, J.M.; KOCHAR, K. D; ALONSO, P.L.; PORTILLO, H.A.D. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet. Infect. Dis.** v. 9, n. 9, p. 555-566, 2009.

MÚFALO, B.C.; GENTIL, F.; BARGIERI, D.Y.; COSTA, F.T.M.; RODRIGUES, M.M.; SOARES, I.S. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes Infect.** v. 10, n. 12-13, p. 1266-1273, 2008.

NARUM, D. L.; OGUN, S. A.; THOMAS, A. W.; HOLDER, A. A. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. **Infect. Immun.** v. 68, n. 5, p. 2899-2906, 2000.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.V.G.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.B.; TAUIL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; Malaria in Brazil: an overview. **Malar. J.** v. 9, p. 115, 2010.

PASAY, M.C.; CHENG, Q.; RZEPCZYK, C.; SAUL, A. Dimorphism of the C terminus of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 70, n. 1-2, p. 217-219, 1995.

PFAHLER, J. M.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; LANZER, M. Transient transfection of *Plasmodium vivax* blood stage parasites. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 149, n. 1, p. 99-101, 2006.

PICHYANGKUL, S.; KUM-ARB, U.; YONGVANITCHIT, K.; LIMSALAKPETCH, A.; GETTAYACAMIN, M.; LANAR, D. E.; WARE, L. A.; STEWART, V. A.; HEPPNER, D. G.; METTENS, P.; COHEN, J. D.; BALLOU, W. R.; FUKUDA, M. M. Preclinical Evaluation of the Safety and Immunogenicity of a Vaccine Consisting of *Plasmodium falciparum* Liver-Stage Antigen 1 with Adjuvant AS01B Administered Alone or Concurrently with the RTS,S/AS01B Vaccine in Rhesus Primates. **Infect. Immun.** v. 76, n. 1, p. 229-238, 2008.

PICHYANGKUL, S.; TONGTAW, P.; KUM-ARB, U.; YONGVANITCHIT, K.; GETTAYACAMIN, M.; HOLLINGDALE, M. R.; LIMSALAKPETCH, A.; STEWART, V. A.; LANAR, D. E.; DUTTA, S.; ANGOV, E.; WARE, L. A.; BERGMANN-LEITNER, E. S.; HOUSE, B.; VOSS, G.; DUBOI, M. C.; COHEN, J. D.; FUKUDA, M. M.; HEPPNER, D. G.; MILLER, R. S. Evaluation of the safety and immunogenicity of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1, merozoite surface protein 1 or RTS,S vaccines with adjuvant system AS02A administered alone or concurrently in rhesus monkeys. **Vaccine**. v. 28, n. 2, p. 452–462, 2009.

POLHEMUS, M. E.; REMICH, S. A.; OGUTU, B. R.; WAITUMBI, J. N.; OTIENO, L.; APOLLO, S.; CUMMINGS, J. F.; KESTER, K. E.; OCKENHOUSE, C. F.; STEWART, A.; OFORI-ANYINAM, O.; RAMBOER, I.; CAHILL, C. P.; LIEVENS, M.; DUBOIS, M. C.; DEMOITIE, M. A.; LEACH, A.; COHEN, J.; BALLOU, W. R.; HEPPNER JR., D. G. Evaluation of RTS,S/AS02A and RTS,S/AS01B in Adults in a High Malaria Transmission Area. **PLoS One**. v. 4, n. 7, e6465, 2009.

PUTAPORNTIP, C.; JONGWUTIWES, S.; SAKIHAMA, N.; FERREIRA, M. U.; KHO, W. G.; KANEKO, A.; KANBARA, H.; HATTORI, T.; TANABE, K. Mosaic organization and heterogeneity in frequency of allelic recombination of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 locus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. v. 99, n. 25, p. 16348-16353, 2002.

QUINTERO, J. P.; SIQUEIRA, A. M.; TOBÓN, A.; BLAIR, S.; MORENO, A.; ARÉVALO-HERRERA, M.; LACERDA, M. V.; Valencia, S.H. Malaria-related anaemia: a Latin American perspective. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 106, suppl. 1, p. 91-104, 2011.

RAPPUOLI, R.; ADEREM, A. A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria. **Nature**. v. 473, n. 7348, p. 463-469, 2011.

RAYNER, J. C.; HUBER, C. S.; FELDMAN, D.; INGRAVALLO, P.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein PvMSP-3 beta is radically polymorphic through mutation and large insertions and deletions. **Infect. Genet. Evol.** v. 4, n. 4, p. 309-319, 2004.

REED, S. G.; BERTHOLET, S.; COLER, R. N.; FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immunol.** v. 30, n. 1, p. 23-32, 2009.

REMARQUE, E. J.; FABER, B. W.; KOCKEN, C. H. M.; THOMAS, A. W. Apical membrane antigen1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends Parasitol.** v. 24, n. 2, p. 74-84, 2008.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos**, 4ª edição, 2008.

RICHARDS, J. S.; BEESON, J. G. The future for blood-stage vaccines against malaria. **Immunol. Cell. Biol.** v. 87, n. 5, p. 377-390, 2009.

RODRIGUES, M. H.; CUNHA, M. G.; MACHADO, R. L.; FERREIRA, O. C. Jr; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. **Malar. J.** v. 2, n. 1, p. 39, 2003.

RODRIGUES, M. H.; RODRIGUES, K. M.; OLIVEIRA, T. R.; COMODO, A. N.; RODRIGUES, M. M.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; SOARES, I. S. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **Int. J. Parasitol.** v. 35, n. 2, p. 185-192, 2005.

ROGERS, W. O.; GOWDA, K.; HOFFMAN, S. L. Construction and immunogenicity of DNA vaccine plasmids encoding four *Plasmodium vivax* candidate vaccine antigens. **Vaccine.** v. 17, n. 23-24, p. 3136-3144, 1999.

ROMAGNOLI, A.; GENTIL, F.; VICENTIN, E. C.; SOARES, I. S. Comparison of the immunogenicity in mice of different recombinant proteins representing the *plasmodium vivax* merozoite surface protein-3. XIII International Congress of Protistology, XXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, XXXVI Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease. IM26, Armação dos Búzios, RJ, 2009.

ROMAGNOLI, A. Avaliação das propriedades imunogênicas das Proteínas 3 α e 3 β da Superfície do Merozoíto de *Plasmodium vivax*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. p 92, 2011.

ROSA, D. S.; TZELEPIS, F.; CUNHA, M. G.; SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. **Immunol. Lett.** v. 92, n. 3, p. 259-268, 2004.

ROSA, D. S.; IWAI, L. K.; TZELEPIS, F.; BARGIERI, D. Y.; MEDEIROS, M. A.; SOARES, I. S.; SIDNEY, J.; SETTE, A.; KALIL, J.; MELLO, L. E.; CUNHA-NETO, E.; RODRIGUES, M. M.; Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ and two human CD4⁺ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). **Microbes Infect.** v. 8, n. 8, p. 2130-2137, 2006.

RUSSELL, B.; SUWANARUSK, R.; BORLON, C.; COSTA, F. T.; CHU, C. S.; RIJKEN, M. J.; SRIPRAWAT, K.; WARTER, L.; KOH, E. G.; MALLERET, B.; COLIN, Y.; BERTRAND, O.; ADAMS, J. H.; D'ALESSANDRO, U.; SNOUNOU, G.; NOSTEN, F.; RÉNIA, L. A reliable ex vivo invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax*. **Blood.** v. 118, n. 13, p. 74-81, 2011.

SACHDEVA, S.; MOHMMED, A.; DASARADHI, P. V.; CRABB, B. S.; KATYAL, A.; MALHOTRA, P.; CHAUHAN, V. S. Immunogenicity and protective efficacy of *Escherichia coli* expressed *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1(42) using human compatible adjuvants. **Vaccine.** v. 24, n. 12, p. 2007-2016, 2006.

Serviço de Vigilância em Saúde (SVS), Situação Epidemiológica da malária no Brasil, 2008. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2008_final.pdf. Acesso em 19 outubro 2009.

SIERRA, A.Y.; BARRERO, C. A.; RODRIGUEZ, R.; SILVA, Y.; MONCADA, C.; VANEGAS, M.; PATARROYO, M. A. Splenectomised and spleen intact *Aotus* monkeys immune response to *Plasmodium vivax* MSP-1 protein fragments and their high activity binding peptides. **Vaccine**. v. 21, n. 27-30, p. 4133-4144, 2003.

SINGH, S.; KENNEDY, M. C.; LONG, C. A.; SAUL, A. J.; MILLER, L. H.; STOWERS, A. W. Biochemical and immunological characterization of bacterially expressed and refolded *Plasmodium falciparum* 42-kilodalton C-terminal merozoite surface protein 1. **Infect. Immun.** v. 71, n. 12, p. 6766-6774, 2003.

SOARES, I. S.; LEVITUS, G.; SOUZA, J. M.; PORTILLO, H. A. D.; RODRIGUES, M. M. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. **Infect. Immun.** v. 65, n. 5, p. 1606-1614, 1997.

SOARES, I. S.; OLIVEIRA, S. G.; SOUZA, J. M.; RODRIGUES, M. M. Antibody response to the N e C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals living in na área of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. **Acta Trop.** v. 72, n. 1, p. 13-24, 1999.

SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*. **Parasitology**. v. 124, pt. 3, p. 237- 246, 2002.

STOWERS, A. W.; CIOCE, V.; SHIMP, R. L.; LAWSON, M.; HUI, G.; MURATOVA, O.; KASLOW, D. C.; ROBINSON, R.; LONG, C. A.; MILLER, L. H. Efficacy of two alternate vaccines based on *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in an *Aotus* challenge trial. **Infect. Immun.** v. 69, n. 3, p. 1536-1546, 2001.

STOWERS, A. W.; KENNEDY, M. C.; KEEGAN, B. P.; SAUL, A.; LONG, C. A.; MILLER, L. H. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. **Infect. Immun.** v. 70, n. 12, p. 6961-6967, 2002.

TEWARI, K.; FLYNN, B. J.; BOSCARDIN, S. B.; KASTENMUELLER, K.; SALAZAR, A. M.; ANDERSON, C. A.; SOUNDARAPANDIAN, V.; AHUMADA, KELER, A.T.; HOFFMAN, S. L.; NUSSENZWEIG, M. C.; STEINMAN, R. M.; SEDER, R. A. Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4+ T cell responses to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) and α -DEC-CSP in non human primates. **Vaccine**. v. 28, n. 45, p. 7256–7266, 2010.

The RTS,S Clinical Trials Partnership. First Results of Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Children. **N. Engl. J. Med.** v. 365, n. 20, p. 1863-1875, 2011.

THOMAS, A. W.; TRAPE, J. F.; ROGIER, C.; GONÇALVES, A.; ROSARIO, V. E.; NARUM, D. L. High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA) as detected by capture-enzyme-linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 51, n. 6, p. 730-740, 1994.

TONKIN, M. L.; ROQUES, M.; LAMARQUE, M. H.; PUGNIÈRE, M.; DOUGUET, D.; CRAWFORD, J.; LEBRUN, M.; BOULANGER, M. J. Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites: Insights from the Co-Structure of AMA1 with a RON2 Peptide. **Science**. v. 333, n. 6041, p. 463-467, 2011.

TRIGLIA, T.; HEALER, J.; CARUANA, S. R.; HODDER, A. N.; ANDERS, R. F.; CRABB, B. S.; COWMAN, A. F. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. **Mol. Microbiol.** v. 38, n. 4, p. 706-718, 2000.

TUTEJA, R. Malaria – an overview. **FEBS J.** v. 274, n. 18, p. 4670-4679, 2007.

VERDIJK, R. M.; MUTIS, T.; ESENDAM, B.; KAMP, J.; MELIEF, C. J.; BRAND, A.; GOULMY, E. Polyriboinosinic Polyribocytidylic Acid (Poly(I:C)) Induces Stable Maturation of Functionally Active Human Dendritic Cells. **J. Immunol.** v. 163, n. 1, p. 57-61, 1999.

VICENTIN, E.C.; FRANÇOZO, K. S.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I.S. Generation and analysis of the immunogenicity of a recombinant protein based on the apical membrane antigen 1 (AMA-1) of *Plasmodium vivax* expressed in *Pichia pastoris*. XIII International Congress of Protistology, XXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, XXXVI Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease. IM04:240, Armação dos Búzios, RJ, 2009.

VICENTIN, E. C. M. Imunizações pré-clínicas contra malária baseadas no Antígeno 1 de Membrana Apical (*PvAMA-1*): testes de protocolos homólogos e heterólogos de indução e reforço utilizando DNA plasmidial e/ou proteína recombinante. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. p 132, 2012.

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. **Clin. Infect. Dis.** v. 46, n. 2, p. 172-173, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malária Report, 2008**. Geneva, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malária Report, 2009**. Geneva, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malária Report, 2010**. Geneva, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malária Report, 2011**. Geneva, 2011.

ZHANG, Z. G.; YU, W. G.; QIU, W. S.; ZHAO, H. M. Immunogenicity of C-terminus of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 expressed as a non-glycosylated polypeptide in yeast. **Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)**. v. 38, n. 6, p. 403-409, 2006.

VIII. Anexos

A1. Composição das soluções, tampões e meios de cultura.

1. Soluções e tampões para eletroforese de proteína (SDS-PAGE).

Gel de corrida: 30% acrilamida; 0,8% bis-acrilamida (Fluka Chemie); 0,75 M Tris/ 0,2% SDS pH 8,8; 0,1% persulfato de amônio; Temed 12 µL (Invitrogen) (vol. final de 10 mL).

Gel de separação: 12% acrilamida; 1,2% bis-acrilamida; 0,25 M Tris/ 0,2% SDS pH 6,8; 0,1% persulfato de amônio; Temed 12 µL (vol. final de 5 mL).

Tampão de amostra para SDS-PAGE (4x): 10% glicerol; 4% SDS; 100 mM 2-mercaptoetanol (Bio-Rad); 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% de azul de bromofenol (Bio-Rad).

Tampão de corrida (1x): 35 mM SDS; 160 mM glicina; 25 mM Tris-HCl pH 8,3.

Solução corante: 1% Coomassie blue R250 (USB); 45% Metanol; 10% ácido acético.

Solução descorante: 45% Etanol; 10% ácido acético.

2. Meios para cultura das bactérias *E. coli*.

LB (Luria Bertani): 2% LB broth base (Invitrogen).

LB-clora: LB; 35 µg/mL de cloranfenicol (USB).

LB-amp: LB; 100 µg/mL de ampicilina (USB).

LB-ágar: LB; 1,5% bacto ágar (BD Biosciences).

3. Meios para cultura da levedura *Pichia pastoris*.

Meio BMGY: 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 20% de tampão fosfato 1M, 0,34% de base nitrogenada de levedura (YNB), 4×10^{-5} % de biotina e 3% de glicerol (Sigma).

Meio BMMY: 1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 100 mM KH₂PO₄, 0,34% de base nitrogenada de levedura, 1% de sulfato de amônio, 4x10⁻⁵% de biotina e 0,5% de metanol.

Meio YPD 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose (glucose).

4. Tampões utilizados durante a sonicação das bactérias *E. coli* e purificação das proteínas MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3β.

Tampão de sonicação: 57,5 mM Tampão Fosfato de Sódio; 128,7 mM NaCl; 10 mg/mL Lisozima; 1 mM PMSF; pH final 7,0

Tampão de lavagem (cromatografia de afinidade): 57,5 mM Fosfato de Sódio; 128,7 mM NaCl; 10% Glicerol; pH final 6,0

Tampão de eluição (cromatografia de afinidade): 57,5 mM Fosfato de Sódio; 128,7 mM NaCl; 10% Glicerol; 0 – 400 mM Imidazol; pH final 6,0

Solução A (troca iônica): Tris-HCl 20 mM, pH=8

Solução B (troca iônica): Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH= 8

Tampão de diálise para estoque das proteínas: PBS; 1 mM PMSF

5. Tampões utilizados durante a purificação da proteína AMA-1.

Tampão de equilíbrio (cromatografia de afinidade): 20mM Tampão fosfato de sódio pH= 8,0; 200mM NaCl

Tampão de lavagem (cromatografia de afinidade): 20mM Tampão fosfato de sódio pH= 8,0; 500mM NaCl; 10%Glicerol ; 1mM de PMSF

Tampão de eluição (cromatografia de afinidade): 20mM Tampão fosfato de sódio pH= 8,0; 500mM NaCl; 10%Glicerol ; 1mM de PMSF; 0 – 400 mM Imidazol;

Solução A (troca iônica): Tris-HCl 20 mM, pH=8

Solução B (troca iônica): Tris-HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH= 8

Tampão de diálise para estoque das proteínas: PBS; 1 mM PMSF

6. Tampões e Soluções utilizados nos ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

Tampão para sensibilização das placas: Tampão Carbonato [15 mM carbonato de sódio (Na_2CO_3), 34,9 mM bicarbonato de sódio (NaHCO_3), pH 9,6].

PBS: 8 mM NaH_2PO_4 , 2,3 mM Na_2HPO_4 , 130 mM NaCl pH final 7,4.

PBS-Tween: PBS, 0,05% Tween 20 (USB).

Tampão fosfato-citrato: 0,2 M NaH_2PO_4 (Synth), 0,2 M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (Synth) pH final 4,5-5,0.

Solução de bloqueio: PBS, 5% de leite em pó desnatado (Molico®), 2,5% de BSA (Sigma).

Solução para diluição de amostra: PBS, 5% leite em pó desnatado (Molico®), 2,5% de BSA (Sigma).

Solução de revelação: σ -Phenylenediamine (OPD, Sigma) 1 mg/mL, 0,03% (v/v) de H_2O_2 , diluídos em tampão fosfato-citrato e H_2O mili Q autoclavada.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança

Of.CIBio/0022011/FCF

São Paulo, 25 de março de 2011

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, e de ordem do senhor Presidente da Comissão Interna de Biossegurança, informo a Vossa Senhoria que estamos aprovando "ad referendum" da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas o Projeto "Análise da resposta imune induzida pela imunização experimental com antígenos recombinantes de *Plasmodium vivax*".

Lembramos que, quando da elaboração do Relatório Anual a ser encaminhado à Comissão Interna de Biossegurança esta Comissão solicitará a V.Sa. comprovante de participação em treinamentos de Biossegurança de sua equipe para manutenção do credenciamento.

Atenciosamente,

Ana Lucia Maioral Volpato
Membro da CIBio

Ilma. Sra.

Profa. Dra. **IRENE DA SILVA SOARES**

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP

NESTA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/42/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Análise da resposta imune induzida pela imunização experimental com antígenos recombinantes de *Plasmodium vivax*" (Protocolo CEUA/FCF/302), de responsabilidade da pesquisadora **Mayne de Oliveria Pereira** sob a orientação da Profa. Dra. Irene da Silva Soares, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 04 de abril de 2011.

São Paulo, 07 de abril de 2011.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P436a Pereira, Mayne de Oliveira
Análise da resposta imune induzida pela imunização experimental
com antígenos recombinantes de *Plasmodium vivax* / Mayne de
Oliveira Pereira. -- São Paulo, 2012.
83p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Soares, Irene da Silva

1. Imunologia : Plasmodium vivax 2. Malaria 3. Vacina :
Farmacologia I. T. II. Soares, Irene da Silva, orientador.

616.9362079 CDD