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

Avaliação das propriedades imunogênicas das Proteínas 3α e 3β da Superfície do Merozoíto de *Plasmodium vivax*

Amanda Romagnoli Bitencourt

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2011

Amanda Romagnoli Bitencourt

Avaliação das propriedades imunogênicas das Proteínas 3α e 3β da Superfície do Merozoíto de *Plasmodium vivax*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

_____
Presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo,____ de _____de 2011.

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 e CNPq como parte do INCTV.

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei, não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

Chico Xavier

Ao meu irmão César (*in memoriam*), pelo amor, carinho e proteção e ao meu marido Daniel, amor da minha vida, parceiro de todos os momentos, paciente e perseverante, incansável na força que sempre me deu na minha vida pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, obrigada por tudo!

Agradeço a Profa. Dra. Irene da Silva Soares, minha orientadora, que me abriu as portas para o conhecimento da malária e ensinou-me a perseguir os ideais da vida acadêmica.

À minha querida família, pelos valores, incentivo, apoio, força e encorajamento. Mãe, você sempre foi exemplo de garra e coragem!

Ao meu amado marido Daniel, pelo alicerce, por estar junto comigo em cada momento e por sempre acreditar que vai dar tudo certo. Amo você!

Aos meus sogros Francisco e Nádia, pela força, incentivo e dedicação. Vocês são especiais!

A Casa de Oração Amor e Luz por me ensinar a aceitar as pessoas como elas são, e a amar ao próximo e principalmente pela minha reforma interior.

Ao Laboratório Oswaldo Cruz por me abrir às portas para o mundo da pesquisa.

Aos meus eternos professores Roberto Ferraboli, Ms. Antonio Desiderio Barbosa, Ms. Sérgio Mengardo e Andréia Ramos de Jesus Do Val, por compartilhar comigo seus conhecimentos e principalmente pela inspiração na decisão de minha profissão.

À querida Profa. Dra. Adelaide José Vaz, pela oportunidade e encaminhamento.

Ao professor Dr. Luís Carlos Ferreira e sua aluna Catarina Braga do Departamento de Microbiologia, ICB/ USP por nos fornecer a Flagelina – FliC (*Salmonella typhimurium*).

Ao professor Dr. Fábio T. M. Costa e sua aluna Juliana Leite da UNICAMP pelas imunofluorescências.

As professoras Dra. Silvia Boscardin e Dra. Eliane Miyaji por terem participado da minha banca de qualificação e principalmente, pelas críticas construtivas.

Aos professores e colegas das turmas de graduação, especialização e pós-graduação, os bons me ensinaram o que devo ser, e os ruins, o que não fazer.

As colegas de trabalho do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo convívio, aprendizado, companheirismo, dedicação, amizade e divertimento. Elaine Vicentin pelo conselho que valeu a pena; Kátia Sanches Françoso pelo carinho, respeito, paciência, companheirismo e humildade transmitida no convívio diário; Luciana Lima pela serenidade, amizade e carinho; Mayne Pereira, Patrícia Ostermayer e Victória Simão pela amizade, carinho e divertimento.

Aos colegas do fretado pelas piadas, jogos e momentos de descontração sem vocês o trajeto São Paulo x São José dos Campos seria mais difícil.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação Ana, Dora, Sueli, Edna, Jorge e Elaine pelos serviços prestados e pelo ótimo atendimento que sempre me deram.

Aos que sempre torceram por mim e aos que me influenciaram positivamente ao longo da minha vida. Sei que mesmo não sendo citados aqui, vocês estão felizes

por mais essa etapa completada. Mas fiquem tranqüilos que não será a última, ainda vou precisar de vocês.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* causadoras de malária no homem..... 8

Figura 2. Estrutura do merozoíto e seus principais antígenos..... 13

Figura 3. Representação esquemática da proteína MSP-3α de *P. vivax*..... 16

Figura 4. Representação esquemática da proteína recombinante MSP-3α (FP-1) em relação à proteína inteira..... 38

Figura 5. Representação esquemática das proteínas recombinantes baseadas na MSP-3β (FP-1, FP-2 e FP-3)..... 38

Figura 6. Análise em SDS-PAGE 12% das proteínas recombinantes purificadas correspondentes à MSP-3α e MSP-3β de *P. vivax*..... 45

Figura 7. Avaliação comparativa da resposta de anticorpos IgG induzida em camundongos BALB/c após a imunização com as proteínas recombinantes MSP-3α (FP-1), MSP-3β (FP-1), MSP-3β (FP-2) e MSP-3β (FP-3)..... 47

Figura 8. Avaliação comparativa da resposta de anticorpos IgG induzida em camundongos C57BL/6 TLR4 *KO* e *Wild Type* imunizados com cada uma das proteínas, na ausência de adjuvantes..... 49

Figura 9. Efeito da imunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante MSP-3α (FP-1) na presença de diferentes adjuvantes..... 51

Figura 10. Efeito da imunização em camundongos BALB/c com a proteína recombinante MSP-3β (FP-3) na presença de diferentes adjuvantes..... 52

Figura 11. Avaliação da resposta de anticorpos de IgG anti-MSP-3 nos soros de camundongos imunizados com a proteína recombinante MSP-3β (FP-3) na presença das diferentes combinações de adjuvantes..... 55

Figura 12. Análise comparativa do reconhecimento dos fragmentos da MSP-3β (FP-1 e FP-2) por soros policlonais contra a proteína inteira (FP-3)..... 57

Figura 13. Análise da reatividade cruzada entre as proteínas MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-3)..... 58

Figura 14. Ensaio de imunofluorescência indireta com soros de camundongos BALB/c após imunizações com cada uma das proteínas baseadas na MSP-3 na presença de ACF/AIF..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sumário das pesquisas com antígenos de *P. vivax* candidatos à vacina 11

Tabela 2- Sumário dos principais antígenos de merozoítos de *P. vivax*... 14

Tabela 3 - Sumário de imunizações experimentais baseadas em MSP-3 de *P. falciparum*..... 18

Tabela 4 - Estudos de imunizações clínicas baseadas em MSP-3 de *P. falciparum*..... 19

Tabela 5- Resposta imune induzida por adjuvantes imunoestimulatórios. 22

Tabela 6 - Resposta imune induzida por sistemas de fornecimentos de antígenos..... 22

Tabela 7 - Avaliação da resposta de anticorpos de isotipos de IgG anti-*Pv*MSP-3 nos soros de camundongos imunizados com proteínas recombinantes MSP-3α (FP-1), MSP-3β (FP-1), MSP-3β (FP-2) e MSP-3β (FP-3)..... 48

Tabela 8 - Avaliação da resposta de anticorpos de isotipos de IgG anti-*Pv*MSP-3 nos soros de camundongos imunizados com a proteína recombinante MSP-3α (FP-1) na presença dos diferentes adjuvantes testados..... 53

Tabela 9 - Avaliação da resposta de anticorpos de isotipos de IgG anti-*Pv*MSP-3 nos soros de camundongos imunizados com a proteína recombinante MSP-3β (FP-3) na presença dos diferentes adjuvantes testados..... 53

Tabela 10 - Avaliação da resposta de anticorpos de isotipos de IgG anti-*Pv*MSP-3 nos soros de camundongos imunizados com a proteína recombinante MSP-3β (FP-3) na presença das diferentes combinações de adjuvantes testados..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
Alum	Hidróxido de Alumínio – sais minerais baseados em alumínio
AMA-1	Antígeno 1 de Membrana Apical
Amp	Ampicilina
BSA	Albumina Sérica Bovina
β-ME	β-mercaptoetanol
CC	“coiled coil”
Clora	cloranfenicol
DBP	“Duffy Binding Protein”
DO	Densidade óptica
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
FliC	Flagelina (*Salmonella typhimurium)*
FP	“Fusion protein”
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IFA	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IPA	Índice Parasitário Anual
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactoside
LB	Luria Bertani
LSP	“Long Synthetic Peptides”
MSP-1	Proteína 1 da Superfície do Merozoíto
MSP-3	Proteína 3 da Superfície do Merozoíto
MSP-9	Proteína 9 da Superfície do Merozoíto
OPD	σ-Phenylenediamine
PBS	Solução salina tamponada com fosfato

PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
Pvs25	Proteína 25 da Superfície do *Plasmodium vivax*
Pvs28	Proteína 28 da Superfície do *Plasmodium vivax*
RBPS	“Reticulocyte Binding Proteins”
rpm	Rotações por minuto
s.c	subcutânea
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SSP2/TRAP	‘Sporozoite Surface Protein 2/Thrombospondin Related Adhesive Protein”
SEM	Erro Padrão da Média
T.A	Temperatura ambiente
TLR	“Toll like receptor”
TEMED	N,N,N’,N’ tetrametil etilenodiamida
Tris	Hidroximetilaminometano

RESUMO

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

O avanço no desenvolvimento de uma vacina contra o *Plasmodium vivax* exige a identificação de antígenos capazes de induzir uma resposta imune protetora contra a malária. O presente estudo avalia o potencial da proteína-3 da superfície de merozoítos de *P. vivax* (*Pv*MSP-3), como candidata a vacina. As proteínas recombinantes representando a região C-terminal da MSP-3α e diferentes regiões (N e C-terminal e proteína inteira) da MSP-3β de *P. vivax* foram utilizadas como antígeno. A imunogenicidade destas proteínas recombinantes foi avaliada em camundongos BALB/c, utilizando adjuvantes agonistas de TLR (flagelina FliC de *Salmonella Typhimurium* e CpG ODN) ou adjuvantes convencionais, tais como hidróxido de alumínio, saponinas, TiterMax Gold e adjuvante incompleto de Freund. Os títulos de anticorpos IgG foram determinados por ELISA utilizando soros de camundongos coletados duas semanas após cada dose de imunização. Nossos resultados demonstraram que a MSP-3α e a MSP-3β foram capazes de induzir altos títulos de anticorpos em camundongos na presença de diferentes adjuvantes, incluindo agonistas de TLR. Dentre as formulações testadas, aquelas contendo os adjuvantes CPG ODN 1826, Quil A, TiterMax e adjuvante incompleto de Freund foram mais imunogênicas e, portanto, mais promissoras para os ensaios pré-clínicos em primatas não-humanos. Usando camundongos TLR-4 KO, nós demonstramos que a proteína MSP-3β tem uma propriedade adjuvante intrínseca que é independente do TLR4 e que a contaminação por LPS na proteína purificada não desempenha qualquer papel no nosso sistema.

Palavras-chave: *Plasmodium vivax*. MSP-3. Vacina recombinante.

ABSTRACT

ROMAGNOLI, A. Analysis of the immunogenic properties of Protein 3α and 3β of the Merozoite Surface of *Plasmodium vivax.* Master thesis (Clinical and toxicological analyses) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo. p 92, 2011.

The advance in the development of a vaccine against *Plasmodium vivax* requires the identification of immunodominant antigens able to induce a protective immune response against malaria. The present study evaluates the potential of the Merozoite Surface Protein 3 of *P. vivax* (*Pv*MSP-3) as vaccine candidate. Recombinant proteins representing the C-terminal region of MSP-3α and different regions of MSP-3β (N and C-terminal and full-length protein) of *P. vivax* were used as antigen. The immunogenicity of these recombinants was evaluated in BALB/c mice using as adjuvant TLR agonists (FliC flagellin of *Salmonella Typhimurium* and CpG motif-containing DNA) or conventional adjuvants such as Aluminum hidroxide, Saponins, TiterMax Gold and Incomplete Freund's Adjuvant. The IgG antibodies were determined by ELISA in sera from mice two weeks after each immunizing dose. Our results demonstrated that MSP-3α and MSP-3β were able to induce high antibody titres in mice in the presence of different adjuvants, including TLR agonists. Among the tested formulations, the adjuvants CPG ODN 1826, Quil A, TiterMax and Incomplete Freund's Adjuvant were more immunogenic, therefore more promising for pre-clinical trials in non-human primates. Using TLR-4 KO mice, we demonstrated that the MSP-3β protein has an intrinsic adjuvant property that is independent of TLR4 and that contaminating LPS in the purified protein did not play any role in our system.

Key-words: *Plasmodium vivax*. MSP-3. Recombinant vaccine.

SUMÁRIO

Lista de figuras xi

Lista de tabelas xii

Lista de abreviaturas xiii

Resumo xv

I. INTRODUÇÃO..... 1

1. Epidemiologia da malária..... 2

2. Espécies causadoras da malária no homem e seu ciclo de vida 3

3. Estágio atual das pesquisas em vacinação contra o *P. vivax*: antígenos, testes pré-clínicos e clínicos 9

4. Família das Proteínas 3 da Superfície do Merozoíto: ênfase na *Pv*MSP-3..... 14

4.1. Estrutura, função e polimorfismo..... 14

4.2. Propriedades imunogênicas..... 17

5. Uso de adjuvantes em vacinas recombinantes..... 21

5.1. Adjuvante Completo de Freund – (ACF)..... 23

5.2. Adjuvante Incompleto de Freund – (AIF)..... 24

5.3. Hidróxido de Alumínio – (Alum)..... 25

5.4. TiterMax..... 27

5.5. Quil A..... 27

5.6. CpG ODN..... 27

5.7. Flagelina (*Salmonella typhimurium)* – (FliC)..... 29

II. OBJETIVOS..... 31

1. Objetivo geral..... 32

2. Objetivos específicos..... 32

III. MATERIAL E MÉTODOS..... 33

1. Composição das soluções, tampões e meios de cultura utilizados..... 34

1.1. Soluções e tampões para eletroforese de proteína (SDS-PAGE)..... 34

1.2. Meios para cultura de bactérias..... 34

1.3. Tampões utilizados para obtenção das proteínas MSP-3α (FP-1), MSP-3β (FP-1, FP-2 e FP-3) a partir do sobrenadante dos extratos bacterianos..... 35

1.4. Soluções e tampões para ensaios imunoenzimáticos (ELISA)..... 35

2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes..... 36

3. Adjuvantes..... 38

4. Imunizações experimentais..... 39

5. Ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-MSP-3α e anti-MSP-3β em camundongos imunizados..... 40

6. Imunofluorescência..... 41

7. Análise estatística..... 43

IV. RESULTADOS..... 44

1. Obtenção das proteínas recombinantes baseadas na MSP-3α e MSP-3β de *P. vivax*..... 45

2. Análise comparativa da imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas na MSP-3α e MSP-3β em camundongos BALB/c, na presença de adjuvante de Freund..... 45

3. Análise comparativa da imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas na MSP-3α e MSP-3β em camundongos C57BL/6 TLR4 *KO* e *Wild Type*, na ausência de adjuvantes..... 48

4. Imunizações pré-clínicas com os domínios selecionados das proteínas MSP-3α e MSP-3β na presença de diferentes adjuvantes..... 50

5. Imunizações pré-clínicas com o domínio selecionado da proteína MSP-3β na presença de diferentes combinações de adjuvantes..... 54

6. Análise da reatividade cruzada entre as proteínas MSP-3α e MSP-3β..... 57

7. Reconhecimento da proteína nativa expressa em merozoítos de *P. vivax* por anticorpos anti-MSP-3..... 58

V. DISCUSSÃO..... 60

VI. CONCLUSÕES..... 68

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 70

VIII. ANEXOS..... 87

I. INTRODUÇÃO

1. Epidemiologia da malária

A malária é um importante problema de saúde pública em aproximadamente 100 países, com quase metade da população mundial em risco. Anualmente ocorrem de 250 a 500 milhões de casos e 1 a 3 milhões de pessoas morrem (WHO, 2010; revisto por ARÉVALO-HERRERA; CHITNIS; HERRERA, 2010). Em áreas de alta transmissão de malária, o ônus da doença é suportado pelas lactantes, crianças e jovens, enquanto em áreas de baixa transmissão a infecção primária pode ocorrer em indivíduos mais velhos, causando doença grave (SCHOFIELD; GRAU, 2005).

Plasmodium falciparum é a principal espécie causadora de malária, sendo responsável por alta mortalidade e morbidade, particularmente entre os jovens e crianças que vivem na África subsariana (WHO, 2010). Por outro lado, *Plasmodium vivax* é o parasito causador da malária mais amplamente distribuído no mundo, o qual é responsável por 80-300 milhões de casos clínicos por ano, incluindo doença grave e morte (revisto por MUELLER et al., 2009; ARÉVALO-HERRERA; CHITNIS; HERRERA, 2010; BASSAT; ALONSO, 2011).

O *P. vivax* exibe uma série de adaptações que permitem que este parasito exista em condições ecológicas e climáticas variadas, desde o clima temperado, subtropical e tropical (GUERRA; SNOW; HAY 2006). Mais de 90% dos casos de infecção por *P. vivax* ocorrem fora da África (WHO, 2008; YESHIWONDIM et al., 2009). Na Índia e Sudeste Asiático, aproximadamente metade de todos os casos de malária são atribuídos ao *P. vivax*. A prevalência é ainda maior nas Américas Central e do Sul, representando 70 a 80% dos casos, onde 225 milhões de pessoas vivem em condições de risco (revisto por BROWN et al., 2009; revisto por ARÉVALO-HERRERA; CHITNIS;

HERRERA, 2010). Na maior parte da África Ocidental e Central a malária *vivax* é pouco documentada, provavelmente devido a ausência do grupo sanguíneo Duffy negativo na população nativa. No entanto, a transmissão da malária por *P. vivax* foi recentemente detectada em populações negativas para o grupo sanguíneo Duffy do Quênia e da região Amazônica Brasileira (RYAN et al., 2006; CAVASINI et al., 2007a; CAVASINI et al., 2007b).

A malária ainda é um grande problema de saúde pública no Brasil, com cerca de 306 mil casos registrados em 2009 (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Embora o principal vetor, o mosquito da espécie *Anopheles darlingi* esteja presente em cerca de 80% do país, atualmente a incidência da malária no Brasil é quase exclusivamente (99,8% dos casos), restrita à região da Bacia do Amazonas, onde uma série de fatores combinados favorece a transmissão da doença e prejudica a utilização de procedimentos de controle convencionais (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Nesta região foram identificados 90 municípios como sendo de alto risco para a malária, ou seja, com um Índice Parasitário Anual (IPA) igual ou maior a 50 casos por 1.000 habitantes. Essa Região é composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Em áreas não endêmicas de malária no Brasil, como São Paulo e Rio de Janeiro, casos graves importados de infecção são relatados nos viajantes onde a plaquetopenia é freqüente (LOMAR et al., 2005).

2. Espécies causadoras da malária no homem e seu ciclo de vida

Das quatro espécies de *Plasmodium* que transmitem a malária ao homem, três encontram-se no Brasil: *P. vivax* que é a espécie de maior prevalência, responsável por

83,7% dos casos registrados em 2009, *P. falciparum* responsável por 16,3% dos casos e *Plasmodium malariae* que é raramente observado (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

A malária é causada por protozoários que pertencem ao filo Apicomplexa, família *Plasmodiidae* do gênero *Plasmodium*. Estes parasitos têm um ciclo de vida complexo com uma fase sexuada que ocorre na fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* e três etapas de reprodução assexuada, sendo uma no hospedeiro invertebrado e as outras duas etapas no hospedeiro vertebrado.

A transmissão da malária acontece através da picada da fêmea do mosquito infectada pelo *Plasmodium*. Os esporozoítos, formas infectantes do parasito, são inoculados na pele do homem sadio através da saliva da fêmea anofelina infectante. Das cerca de 400 espécies de *Anopheles* em todo o mundo, cerca de 60 são vetores da malária. Mais de 100 espécies de *Plasmodium* podem infectar numerosas espécies animais, tais como répteis, aves e mamíferos, mas apenas quatro espécies de *Plasmodium* podem infectar o homem em condições naturais: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. Estas quatro espécies diferem não só morfologicamente, mas também biologicamente (revisto por TUJERA, 2007).

Estudos recentes relatam a existência de uma quinta espécie de *Plasmodium* que pode infectar o homem. *Plasmodium knowlesi,* uma espécie conhecida por infectar macacos *Rhesus* (Macaca mulatta), vem sendo diagnosticado no sudeste da Ásia (região de Bornéu malaio se estendendo até a península da Malásia). Até recentemente essa espécie de *Plasmodium* vinha sendo diagnosticada erroneamente como *P. malariae* (SINGH et al., 2004; WHITE, 2008; COX-SINGH et al., 2008).

Das espécies capazes de infectar o homem, duas, *P. vivax* e *P. ovale,* apresentam uma forma dormente do parasito no fígado, os hipnozoítos. Estas formas podem

permanecer em estado de latência por períodos que variam de 1 mês a 2 anos. Nestes casos, que recebem a denominação de recaídas, a pessoa infectada volta a apresentar a doença por uma ou mais vezes após o tratamento inicial, mesmo que não tenha freqüentado áreas com transmissão, devido à reativação dos hipnozoítos. Os mecanismos envolvidos no desencadeamento desta reativação ainda não foram esclarecidos (BELL et al., 2009).

O ciclo de vida do parasito da malária é mostrado na Figura 1 e pode ser dividido em várias etapas, começando com a entrada de esporozoítos na derme do hospedeiro vertebrado. Estudos recentes utilizando parasitos das espécies de roedores (*Plasmodium yoelii e Plasmodium berghei)* indicam que, grande parte dos esporozoítos infectantes permanece no local da picada durante horas, com liberação lenta na circulação (YAMAUCHI et al., 2007). Aproximadamente 50% dos esporozoítos deixam a derme, de maneira que dentre estes, 70% atingem os vasos sangüíneos dirigindo-se para o fígado, invadindo hepatócitos, enquanto os 30% restantes invadem os vasos linfáticos. Estes esporozoítos que são levados através dos vasos linfáticos apresentam um movimento de deslizamento lateral, sendo detectados posteriormente nos linfonodos, onde entram em contato com células do sistema imune, e apenas uma pequena porcentagem se desenvolve na forma exo-eritrocítica (AMINO et al., 2006).

Na corrente sangüínea, os esporozoítos chegam ao fígado e penetram nas células hepáticas (hepatócitos), onde permanecem por 9-16 dias e sofrem replicação assexuada conhecida como esquizogonia pré-eritrocítica ou exo-eritrocítica. O mecanismo de invasão dos hepatócitos ainda não está bem compreendido, mas estudos mostraram que esporozoítos migram através dos hepatócitos dos mamíferos hospedeiros (revisto por TUJERA, 2007). Cada esporozoíto dá origem a milhares de

merozoítos dentro do hepatócito e cada merozoíto pode invadir uma célula vermelha do sangue. Em um estudo interessante, também usando *P. berghei*, foi demonstrado que os parasitos que saem do fígado são capazes de manipular células do hospedeiro para garantir a sobrevivência dos merozoítos na corrente sanguínea (STURM et al., 2006). Organelas denominadas de merossomos parecem agir como transporte que garantem a proteção dos parasitos do sistema imunológico do hospedeiro e a liberação de merozoítos viáveis diretamente na circulação sanguínea (STURM et al., 2006). O tempo necessário para completar essa fase varia de acordo com a espécie infectante, (8-25 dias para *P. falciparum*, 8-27 dias para *P. vivax*, 9-17 dias para *P. ovale* e 15-30 dias para *P. malariae*), e este intervalo é chamado de período pré-patente.

Merozoítos entram nas hemácias por um processo complexo de invasão, que pode ser dividido em quatro fases: (a) inicial, reconhecimento e fixação reversível do merozoíto à membrana eritrocitária; (b) reorientação e liberação de substâncias das roptrias e micronema; (c) invaginação da membrana do eritrócito em torno do merozoíto acompanhada pela remoção do revestimento da superfície de merozoítos e (d) formação do vacúolo parasitário, após a invasão do merozoíto (revisto por TUJERA, 2007).

A divisão assexuada sanguínea ocorre no interior do eritrócito e os parasitos se desenvolvem em diferentes estágios. É importante ressaltar que, ao contrário do *P. falciparum,* que invade eritrócitos de todas as idades, o *P. vivax* infecta e se multiplica exclusivamente em eritrócitos jovens (reticulócitos). O final desta fase é marcado por múltiplas divisões nucleares resultando na formação dos esquizontes. Cada esquizonte maduro contém cerca de 20 merozoítos e estes são liberados após a lise dos glóbulos vermelhos para invadir mais hemácias. Este estágio coincide com a elevação da

temperatura corporal durante a progressão da doença. Este ciclo repetitivo de invasão intra-eritrocítica, liberação e multiplicação contínua, têm cerca de 48 horas em *P. falciparum, P. ovale* e *P. vivax* e 72 horas para *P. malariae*. O conteúdo das células vermelhas do sangue infectadas que é liberado após a sua lise estimula a produção de algumas citocinas (TNF-α, IL-12 e IFN-γ), que são responsáveis pelas manifestações clínicas características da doença (WU et al., 2010).

O sequênciamento do genoma do *P. falciparum*, concluído em 2002, indica que várias moléculas envolvidas na invasão são membros de numerosas famílias de proteínas (BOWMAN et al., 1999; GARDNER et al., 2002). Proteínas de superfície de merozoítos (MSP) de 1 a 4 são importantes proteínas integrais da membrana que estão envolvidas no reconhecimento inicial dos eritrócitos e é provável que sejam importantes para a invasão, porque os anticorpos contra estas proteínas podem bloquear este processo (revisto por TUJERA, 2007).

Uma pequena porção dos merozoítos nos glóbulos vermelhos eventualmente diferencia-se para produzir micro e macrogametócitos (masculino e feminino, respectivamente). Estes gametócitos são essenciais para a continuidade do ciclo no hospedeiro invertebrado.

Em geral, um número variável de ciclos de esquizogonia eritrocítica assexuada ocorre antes de qualquer gametócito ser produzido. Em *P. falciparum*, a esquizogonia leva 48 horas e a gametocitogênese leva 10-12 dias. Os gametócitos aparecem no quinto dia de ataque primário em infecções por *P. vivax* e *P. ovale* e, posteriormente, tornam-se mais numerosos. Para *P. malariae* eles aparecem em 5-23 dias após um ataque primário. O mosquito ao realizar seu repasto sanguíneo em um indivíduo

infectado pode ingerir esses gametócitos. No vetor, somente os gametócitos serão capazes de evoluir, dando origem ao ciclo sexuado ou esporogônico. O gametócito masculino, por um processo denominado exflagelação, dá origem a oito microgametas e o gametócito feminino transforma-se em macrogameta. Cada microgameta fecundará um macrogameta, formando o ovo ou o zigoto que é móvel e atravessa a parede do intestino médio, encistando-se na camada epitelial do órgão, passando a ser denominado oocisto. Inicia-se então o processo de divisão esporogônica e, após a ruptura da parede do oocisto, os esporozoítos infectantes são encontrados nas glândulas salivares cerca de 10-18 dias depois. Posteriormente, o mosquito permanece infectante por 1-2 meses. Quando a fêmea do *Anopheles* infectada inocula esporozoítos na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado durante novo repasto sanguíneo, o ciclo de vida do parasito reinicia-se (revisto por TUJERA, 2007).

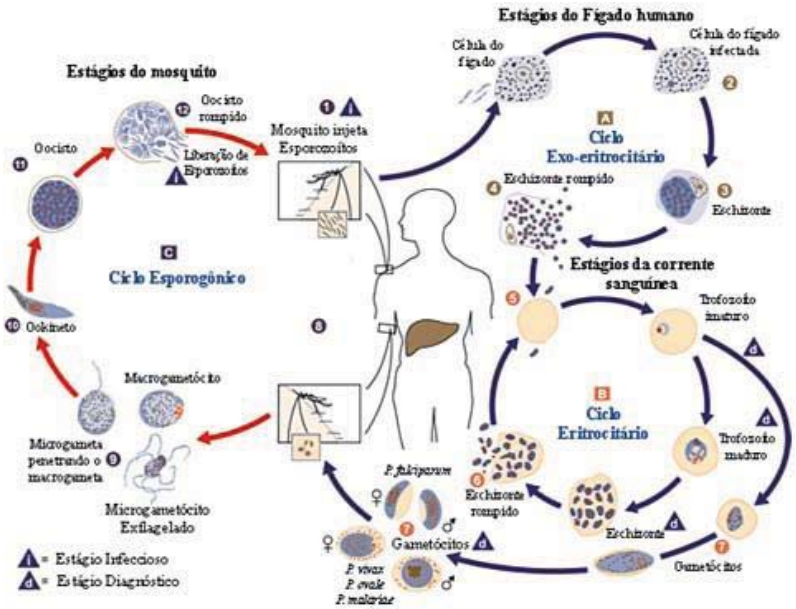

Figura 1. Ciclo de vida das espécies de *Plasmodium* causadoras de malária no homem. Adaptado do site www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-4042200800. (Acessado em 19 de abril de 2010).

3. Estágio atual das pesquisas em vacinação contra o *P. vivax*: antígenos, testes pré-clínicos e clínicos

Os esforços nas pesquisas e desenvolvimento de vacinas contra a malária tiveram início nos anos 1980 e têm sido quase que exclusivamente focados em *P. falciparum* (WHO, 2008). Nos últimos anos, foram publicados vários ensaios de fase II de vacinação contra a malária *falciparum*, utilizando antígenos sintéticos ou recombinantes baseados em proteínas do parasito. Esses antígenos, se utilizados em uma vacina, poderiam induzir mecanismos capazes de diminuir ou mesmo bloquear os efeitos do parasito e da doença no homem (revisto por REED et al., 2009).

Atualmente, mais de 70 formulações de vacina para o *P. falciparum* estão disponíveis e 23 destas encontram-se em fase clínica (revisto por REED et al., 2009). Ao contrário, apenas 2 candidatos a uma vacina contra *P. vivax* foram testados no homem, a proteína do circunsporozoíto (CSP) e a proteína de superfície 25 de *P. vivax* (*Pv*s25) e um modesto número de candidatos a uma vacina estão em testes pré-clínicos (HERRERA et al., 2005; MALKIN et al., 2005; BELL et al., 2009; MOON et al., 2010). Na maioria das áreas endêmicas as duas espécies coexistem (*P. falciparum* e *P. vivax*), por isso, é compreensível tanto investimento para *P. falciparum* e atrasos na identificação de antígenos e desenvolvimento de vacinas de subunidades contra o *P. vivax* (HERRERA; CORRADIN; ARÉVALO-HERRERA, 2007).

Acredita-se que uma vacina combinada contra a malária seja mais eficaz do que as vacinas baseadas em um único antígeno. Com isso, várias tentativas estão sendo feitas para desenvolver uma vacina usando uma mistura de mais de um antígeno (MAZUMDAR et al., 2010). Deve ser lembrado que o *P. falciparum* e o *P. vivax* são

espécies evolutivamente muito distantes e que a vacinação com antígenos de uma espécie provavelmente não forneça proteção contra a outra espécie (GALINSKI; BARNWELL, 2008).

O desenvolvimento de uma vacina contra *P. vivax* tem sido um grande desafio, devido aos financiamentos limitados para pesquisa e dificuldades técnicas, como a ausência de um eficiente e contínuo sistema de cultura do parasito *in vitro.* Entretanto, progressos importantes têm sido alcançados na identificação e caracterização de diferentes antígenos de *P. vivax* (HERRERA; CORRADIN; ARÉVALO-HERRERA, 2007). Na ausência de cultivo *in vitro*, as únicas fontes de material disponíveis para investigar diretamente a genética, a biologia, o metabolismo, a imunidade e a patologia do *P. vivax* são pessoas e macacos infectados (GALINSKI; BARNWELL, 2008). Os mais importantes antígenos, candidatos a comporem uma vacina, estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Sumário das pesquisas com antígenos de *P. vivax* candidatos à vacina (tabela adaptada da revisão de HERRERA; CORRADIN; ARÉVALO-HERRERA, 2007).

Estágio do parasito	Antígeno	Tipo	Pesquisa	Testes pré-clínicos em roedores	Testes pré-clínicos em primatas	Testes clínicos Fase 1
Pré-eritrocítico	CSP-N	LSP	Sim	Sim	Sim	Sim
	CSP-R	LSP	Sim	Sim	Sim	Sim
	CSP-C	LSP	Sim	Sim	Sim	Sim
	SSP2/TRAP	LSP	Sim	Não	Não	Não
Eritrocítico (assexuado)	MSP-1 (19/42)	REC	Sim	Sim	Sim	Não
	MSP-1(200L)	REC	Sim	Sim	Sim	Não
	MSP-9	REC	Não	Sim	Não	Não
	DBP-R-II	REC	Sim	Sim	Sim	Não
	AMA-1	REC	Sim	Não	Sim	Não
Eritrocítico (sexuado)	Pvs25	REC	Sim	Não	Sim	Sim
	Pvs28	REC	Sim	Não	Sim	Não
Combinação	CSP, SSP2, AMA-1, MSP-1	DNA	Sim	Não	Sim	Não

CSP = Circumsporozoite Protein; DBP = Duffy Binding Protein; LSP = Long Synthetic Peptides; SSP2/TRAP = Sporozoite Surface Protein 2/Thrombospondin Related Adhesive Protein; AMA-1 = Apical Membrane Antigen 1; Rec = Recombinant protein; MSP-1 = Merozoite Surface Protein 1; *Pv*s25 = *P. vivax* Surface Protein 25; MSP-9 = Merozoite Surface Protein 9; *Pv*s28= *P. vivax* Surface Protein 28.

Mais investimentos e um maior esforço para o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax* são necessários. Principalmente devido a ampla distribuição geográfica desse parasito, aumento da resistência às drogas e observações recentes de casos graves e letais de malária *vivax* (KRISTOFF, 2007). Para melhor compreensão sobre a imunidade na malária, ensaios utilizando a tecnologia do DNA recombinante de *Plasmodium,* permitiram a obtenção de diversas proteínas recombinantes, as quais estão sendo utilizadas em estudos imuno-epidemiológicos e imunizações experimentais, visando uma melhor compreensão da resposta imune e o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax* (ARÉVALO-HERRERA; HERRERA, 2001; revisto por HERRERA; CORRADIN; ARÉVALO-HERRERA, 2007). Além disso, a finalização do projeto genoma de *P. vivax* (CARLTON et al., 2008), permitirá avanços

na área proteômica visando à caracterização de novos antígenos e o estudo de suas funções biológicas.

O parasito da malária passa por diferentes estágios no homem, com isso diferentes antígenos são apresentados para o sistema imune gerando uma resposta distinta para cada um desses estágios. Com base nisso, diferentes estratégias de imunização estão sendo estudadas: (i) vacina contra os estágios pré-eritrocíticos, cujo objetivo é impedir a entrada de esporozoítos nos hepatócitos e, assim, inibir o desenvolvimento dos esquizontes nos tecidos (CLYDE, 1990). (ii) vacinas contra os estágios eritrocíticos, com a finalidade de reduzir a sintomatologia da malária e formas graves da doença. (iii) vacinas contra os gametócitos, bloqueadoras de transmissão, que impediriam a propagação do parasito entre os seres humanos (TSUBOI et al., 2003; revisto por ARÉVALO-HERRERA; CHITNIS; HERRERA, 2010).

Os antígenos estudados nesse projeto fazem parte dos estágios eritrocíticos, que são responsáveis pela patogênese da malária. Tentativas de bloquear o desenvolvimento do parasito nesta fase através da vacinação seria uma probabilidade de reduzir os sintomas clínicos da malária. Como interface principal entre o hospedeiro e o patógeno, a superfície de merozoítos é um alvo óbvio para o desenvolvimento de uma vacina contra a malária. Uma série de candidatos potenciais à vacina identificados até o momento estão localizados ou associados com a superfície do merozoíto ou com a organela apical (Figura 2) (RICHARDS; BEESON, 2009). Estes incluem Proteína 1 da Superfície do Merozoíto (MSP-1), os membros da família da Proteína 3 da Superfície do Merozoíto (MSP-3), e o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1), que estão implicadas no processo de invasão dos eritrócitos (MAHANTY; SAUL; MILLER, 2003; GALINSKI;

BARWELL, 2008; MAZUMDAR et al., 2010). Além dos já acima citados, muitos outros antígenos como “Reticulocyte Binding Proteins” (RBPs), “Duffy Binding Protein” (DBP) e Proteína 9 da Superfície do Merozoíto (MSP-9) estão entre os antígenos estudados da fase pré-clínica (TEMPLETON; KASLOW, 1997; VARGAS-SERRATO et al., 2002).

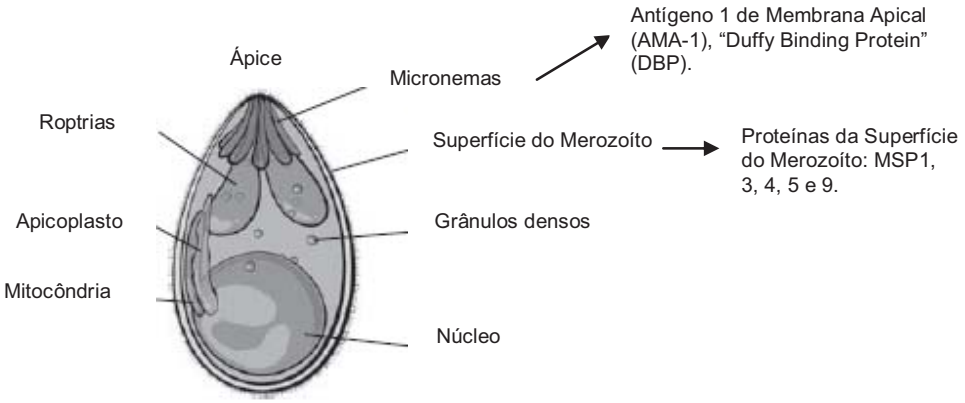

Figura 2. Estrutura do merozoíto e seus principais antígenos. Figura adaptada (RICHARDS; BEESON, 2009).

Anticorpos têm um papel importante na proteção através de vários mecanismos, incluindo inibição da invasão do parasito (HERRERA; CORRADIN; ARÉVALO-HERRERA, 2007). Antígenos da fase assexuada do sangue podem induzir a liberação de citocinas (por exemplo, IFN-γ) que possivelmente contribuam para a imunidade protetora (HERRERA et al., 1992). Portanto, as vacinas destinadas aos estágios sangüíneos assexuados devem ser capazes de induzir anticorpos e citocinas. Dos vários antígenos de parasitos assexuados de *P. vivax* que foram identificados e caracterizados imunologicamente, os que recebem mais atenção são a Proteína 1 da Superfície do Merozoíto (MSP-1), a “Duffy Binding Protein” (DBP) e o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) (FREEMAN; HOLDER, 1983; FANG et al., 1991; HODDER et al., 1996).

Um dos critérios para priorizar objetivamente antígenos de merozoítos para o desenvolvimento de vacina contra a malária é a demonstração de que anticorpos naturalmente adquiridos estão associados a proteção contra a malária (BARNWELL; GALINSKI, 1995). Na tabela 2 estão apresentados os principais antígenos de merozoítos descritos até o presente momento.

Tabela 2 – Sumário dos principais antígenos de merozoítos de *P. vivax*.

Antígenos de Merozoítos	Tamanho kDa	Referência
AMA-1	66	NARUM; THOMAS, 1994
DBP	140	FANG et al., 1991
MSP-1	200	DEL PORTILLO et al., 1991
MSP-3β	104	GALINSKI et al., 2001
MSP-3α	150	GALINSKI et al., 1999
MSP-4	62	BLACK et al., 2002
MSP-5	86	BLACK et al., 2002
MSP-9	185	BARNWELL et al., 1999

4. Família das Proteínas 3 da Superfície do Merozoíto: ênfase na *Pv*MSP-3

4.1. Estrutura, função e polimorfismo

Há mais de 10 anos foram identificadas mais três proteínas da superfície do merozoíto de *P. vivax* que foram denominadas Proteína 3α da Superfície do Merozoíto (MSP-3α) (GALINSKI et al., 1999), MSP-3β e MSP-3γ (GALINSKI et al., 2001). Estas proteínas estão associadas à membrana, entretanto não apresentam uma região transmembrana e nem âncora de GPI. Essa família de proteínas possui características antigênicas distintas (GALINSKI; BARNWELL, 2008).

A cepa Salvador I do projeto genoma revelou onze genes codificando a MSP-3 de *P. vivax* com características semelhantes distribuídos em um único *locus* (CARLTON et al., 2008; GALINSKI; BARNWELL, 2008). Todos os onze genes codificam proteínas que compartilham as mesmas características estruturais e um domínio central rico em alanina com repetições “heptad” formando “coiled-coil” do tipo estrutura terciária (GALINSKI et al., 1999, 2001).

A estrutura primária deduzida a partir do gene clonado da MSP-3α (cepa Belém) indica que esta proteína é constituída de 845 aminoácidos e tem um peso molecular aparente de 150 KDa. O domínio central desta proteína é rico em alaninas (31%) que estão organizadas como motivos “heptads” (GALINSKI et al., 1999). Estas alaninas preenchem preferencialmente as posições 1 e 4. As posições 5 e 7 são preferencialmente preenchidas por aminoácidos carregados. Este tipo de estrutura primária favorece estruturas terciárias do tipo α-hélices e “coiled-coil”. Estruturas do tipo “coiled-coil” por sua vez favorecem as interações proteína-proteína que podem levar a formação de estruturas quaternárias homólogas ou heterólogas do tipo dímeros, trímeros ou tetrâmeros. Estudos realizados recentemente em nosso laboratório sobre a caracterização preliminar da composição da estrutura secundária das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3α por dicroísmo circular (DC) confirmaram a predição para a formação de estrutura α-hélice (JIMENEZ et al., 2008).

Foi demonstrado que o gene que codifica a proteína MSP-3α é altamente polimórfico apresentando regiões de inserção e deleção entre diferentes isolados de *P. vivax*. A natureza polimórfica da MSP-3α a torna um marcador ideal para distinguir diferentes infecções em estudos epidemiológicos (BRUCE et al., 1999; RAYNER et al., 2002; CRISTIANO et al., 2008; ARESHA et al., 2008). Apesar do alto grau de

polimorfismo, a região C-terminal se mantêm conservada, possuindo subdomínios envolvidos em dois blocos (Bloco I: porção N-terminal polimórfica e Bloco II: região C-terminal de menor variabilidade). Em ambos subdomínios definidos, há uma alta probabilidade (quase 100%) para formação de estrutura do tipo “coiled-coil” (Figura 3) . Dentre as proteínas de *P. vivax*, a MSP-3α está estruturalmente relacionada com as proteínas MSP-3β e MSP-3γ (GALINSKI et al., 2001).

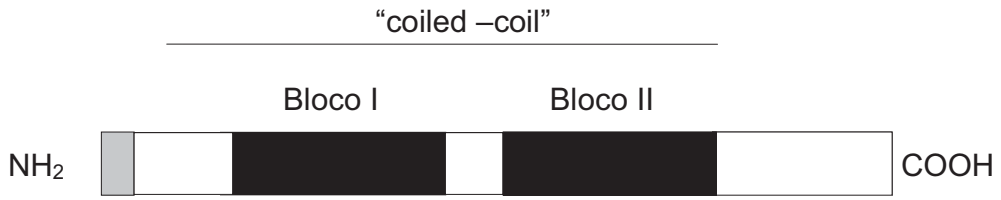

Figura 3. Representação esquemática da proteína MSP-3α de *P. vivax*. As regiões com alta predição para formação de “coiled-coil” estão destacadas em preto (adaptado de RAYNER et al., 2002).

A MSP-3β está também localizada na membrana de merozoítos de *P. vivax*. Como no caso da MSP-3α, 23% dos aminoácidos que compõe o domínio central desta proteína é constituído por alaninas que estão organizadas como motivos “heptads”. Estas proteínas possuem um total de cinco regiões promissoras para a formação “coiled-coil” (GALINSKI et al., 2001). Apesar do gene que codifica a proteína MSP-3β ser altamente polimórfico em isolados naturais de *P. vivax*, certas propriedades físicas da proteína são mantidas, particularmente a habilidade para formação da estrutura terciária em “coiled-coil”. Estes dados sugerem que a manutenção destes domínios estruturais deve ser importante do ponto de vista funcional da proteína (RAYNER et al., 2004).

A proteína MSP-3 de *P. falciparum* (*Pf*MSP-3) apresenta similaridades com as proteínas da família MSP-3 de *P. vivax* em relação à formação de um domínio com alta predição para a formação de "coiled-coil". A *Pf*MSP-3 apresenta 3 diferentes domínios: um domínio central formado por repetições imperfeitas de "heptads" de alanina, uma segunda região central rica em resíduos de glutamato e um domínio C-terminal de zíper de leucina. Através de estudos biofísicos foi demonstrado que a proteína de *P. falciparum* se processa em uma estrutura altamente estendida e oligomérica possuindo 47% de α-hélice e 31% de estrutura randômica (BURGESS; SCHUCK; GARBOCZI, 2005).

4.2. Propriedades imunogênicas

A maioria dos estudos focando a imunogenicidade da MSP-3 tem sido feito em *P. falciparum*. Diferentes grupos vêm desenvolvendo imunizações experimentais (camundongos e macacos) com proteínas (nativas ou recombinantes) ou peptídeos sintéticos baseados na *Pf*MSP-3, conforme apresentado na tabela 3. As primeiras imunizações foram feitas em camundongos utilizando proteína nativa (BADELL et al., 2000). Posteriormente, a imunização de primatas (*Aotus nancymai*) com LSP (*LongSynthetic Peptides*) levou à proteção contra a infecção (HISAEDA et al., 2002).

Já foram realizados experimentos em primatas (*Saimiri sciureus)* para verificar a imunogenicidade e a eficácia protetora de diferentes formulações antígeno-adjuvante. A proteína *Pf*MSP-3 em Montanide ISA 720 foi capaz de induzir proteção nos macacos imunizados. Os dados são indicativos que a MSP-3 pode induzir imunidade protetora contra uma infecção experimental de *P. falciparum*, utilizando adjuvantes que sejam

aceitáveis para uso humano e isto deverá desencadear estudos com esses antígenos (CARVALHO et al., 2005).

Estudos subsequentes mostraram que imunizações de camundongos com a proteína recombinante *Pf*MSP-3 emulsificada em Hidróxido de Alumínio (Alum) e Montanide ISA 720 induziram anticorpos específicos (POLLEY et al., 2007).

Tabela 3 - Sumário de imunizações experimentais baseadas em MSP-3 de *P. falciparum*.

Espécie	Modelo	Tipo de antígeno	Sistema de expressão	Resultado	Referência
P. falciparum	camundongo	Proteína nativa	_____	Proteção contra a infecção	BADELL et al., 2000
P. falciparum	Macaco	LSP*	Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)	Proteção contra a infecção	HISAEDA et al., 2002
P. falciparum	Macaco	Proteína recombinante	Bactéria (*Lactococcus lactis)*	Proteção contra a infecção	CARVALHO et al., 2005
P. falciparum	camundongo	LSP*	Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)	Anticorpos capazes de inibir a invasão de eritrócitos	DRUILHE et al., 2005
P. falciparum	camundongo	Proteína recombinante	Bactéria (*Escherichia coli*)	Imunogênica	POLLEY et al., 2007
P. falciparum	Macaco	LSP*	Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)	Proteção contra a infecção	PERLAZA et al., 2008
P. falciparum	Macaco	Proteína recombinante	Bactéria (*Escherichia coli*)	Proteção contra a infecção	TSAI et al., 2009

**LongSynthetic Peptides*

A *Pf*MSP-3 é considerada candidata a vacina contra a fase sanguínea e testes clínicos estão em andamento na África (AUDRAN et al., 2005; SIRIMA et al., 2007). Pesquisas recentes com a proteína MSPFu24, que é a fusão da $MSP1_{19}$ com a região conservada de 11 kDa da MSP-3 ($MSP\text{-}3_{11}$) de *P. falciparum* demonstraram que essa proteína quimérica é altamente imunogênica em camundongos e coelhos e os dados

obtidos sugerem que a mesma possui potencial para ser uma candidata a vacina contra a malária (MAZUMDAR et al., 2010). Estudos de imunizações clínicas baseadas em MSP-3 de *P. falciparum* estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Estudos de imunizações clínicas baseadas em MSP-3 de *P. falciparum*.

Fase	Proteína	Adjuvante	Resultado	Referência
1	*Pf*MSP3$_{181-276}$	Hidróxido de alumínio* e Montanide ISA 720	Segura e imunogênica quando administrada com Hidróxido de alumínio e reatogênica com Montanide ISA 720	AUDRAN et al., 2005; DRUILHE et al., 2005
1a	*Pf*GMZ2 (proteína de fusão glutamate-rich protein GLURP$_{27-500}$ e MSP3$_{212-380}$)	Hidróxido de alumínio*	Segura e imunogênica	ESEN et al., 2009
1b	*Pf*MSP3$_{186-276}$	Hidróxido de alumínio*	Segura e imunogênica	NEBIE et al., 2009
1b	*Pf*MSP3$_{154-249}$	Hidróxido de alumínio*	Segura e imunogênica	LUSINGU et al., 2009

* Alum

No que se refere a *Pv*MSP-3, há alguns anos, a imunização de macacos *Saimiri boliviensis* com dois produtos da família MSP-3 de *P. vivax* (*Pv*MSP-3α e *Pv*MSP-3β), expressos em *E. coli* e utilizando adjuvante completo de Freund (ACF) induziu forte resposta de anticorpos, determinadas por imunofluorescência indireta e ELISA (títulos > 10^6). Além disso, as MSP-3α e β foram capazes de induzir um modesto nível de proteção através da redução do pico de parasitemia de 60 e 70%, respectivamente. Posteriormente, a imunização de *Saimiri boliviensis* com a proteína recombinante *Pv*MSP-3α expressa em *E. coli* formulada em Montanide ISA-720 não conferiu nenhuma proteção. Considerando-se o número de genes que codificam a MSP-3 potencialmente expressos em merozoítos de *P. vivax* e a diversidade alélica demonstrada por esta família de antígenos, os dados de imunização sugerem que uma

das onze proteínas da MSP3 pode ser mais expressa em relação as outras (GALINSKI; BARNWELL, 2008).

Com o objetivo de caracterizar a resposta imune naturalmente adquirida contra proteínas de merozoítos de *P. vivax*, o nosso grupo produziu previamente quatro proteínas recombinantes baseadas na MSP-3α (C-terminal) e MSP-3β (N e C-terminal, proteína inteira) (JIMENEZ et al., 2008). Todas as proteínas recombinantes foram geradas a partir do vetor pET-28a em fusão com calda de histidina (his-tag). Estas proteínas recombinantes foram comparadas quanto ao reconhecimento por anticorpos IgG de indivíduos de áreas endêmicas de malária do estado do Pará. A freqüência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG durante a infecção patente contra pelo menos uma das proteínas recombinantes representando a MSP-3α e MSP-3β foi de 68,2% e 79,1%, respectivamente (JIMENEZ, 2007). No geral, as freqüências de indivíduos que apresentaram anticorpos contra as proteínas MSP-3α e MSP-3β variaram entre 26,4% para MSP-3β (FP-1) a 68,2% para MSP-3α (FP-1). Recentemente, em áreas endêmicas de malária da Região Amazônica Brasileira a proteína MSP-3α foi comparada quanto ao reconhecimento por anticorpos IgG, onde a freqüência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG durante a infecção patente contra a MSP-3α foi de 59,8% (MOURÃO et al., 2010). Estes estudos confirmaram dados prévios que as MSP-3 são imunogênicas em infecções naturais (CUNHA, 2001; JIMENEZ, 2007). Em conjunto, nossos resultados prévios sugerem que proteínas recombinantes baseadas na MSP-3α e MSP-3β podem ser exploradas em estudos de indução de imunidade protetora contra a malária *vivax* em primatas não humanos.

5. Uso de adjuvantes em vacinas recombinantes

O termo adjuvante deriva do latim *adjuvare*, que significa ajudar ou adicionar (COX; COULTER, 1997). Adjuvantes são moléculas, componentes ou macromoléculas complexas que aumentam a potência e a longevidade de uma resposta imune específica a um antígeno (WACK; RAPPUOLI, 2005). A adição de adjuvantes a vacinas aumenta, prolonga e direciona a resposta imune aos antígenos. Dessa forma, o uso de adjuvantes modula a resposta imune e reduz a quantidade de antígeno ou o número de imunizações necessárias, gerando uma vacina mais efetiva (KENNEY; EDELMAN, 2003; revisto por COFFMAN; SHER; SEDER, 2010). Adjuvantes possuem uma eficácia dependente de uma apropriada formulação, contudo, ambos, componentes e formulação, do adjuvante (ex. óleo em água, tamanho de partícula, etc.), são cruciais para o aumento da potência de uma vacina (revisto por REED et al., 2009).

Os adjuvantes podem ser classificados de acordo com a sua propriedade físico-química, origem, e seus mecanismos de ação. A classificação mais aceita atualmente é com base em seus mecanismos dominantes de ação. Assim os adjuvantes podem ser divididos em imunoestimulatórios (potenciadores imunes) ou baseados em um sistema de fornecimento de antígeno ("Adjuvant Delivery System"), os quais serão abordados a seguir:

Imunoestimulatórios (Tabela 5): agem diretamente no sistema imune para aumentar a resposta aos antígenos. Incluem exemplos como: ligantes de *Toll like receptor* (TLR), citocinas, saponinas e exotoxina de bactérias;

Sistema de fornecimento de antígenos (Tabela 6): apresentam antígenos para o sistema imune, incluindo liberação controlada e sistema de entrega ("Depot Delivery

Systems"), para aumentar a resposta imune específica a um determinado antígeno. Incluem como exemplo: sais minerais, emulsões, lipossomos, virossomos, microesferas de polímeros biodegradáveis e complexos imune-estimulantes (ex. ISCOM, ISCOMATRIX™) (revisto por REED et al., 2009).

Tabela 5 - Resposta imune induzida por adjuvantes imunoestimulatórios
(tabela adaptada da revisão de REED et al., 2009).

Imunoestimulatórios	Interação celular	Tipo de resposta imune
ACF (micobactéria)	TLR-2	Th1, Ac* e ***NK
CpG-ODN (DNA)	TLR-9	Th1, **CTL, Ac e NK
Quil A (saponina)	Processamento de antígeno	Th1, CTL, Ac
Flagelina (*Salmonella typhimurium)* – (FliC)	TLR-5	Th2

*Ac (anticorpos), **CTL (Linfócitos T Citotóxicos), ***NK (*Natural Killer Cells*).

Tabela 6 - Resposta imune induzida por sistemas de fornecimentos de antígenos
(tabela adaptada da revisão de REED et al., 2009).

Sistemas de fornecimentos de antígenos	Resposta Th1	Resposta Th2	Resposta célula B	Persistência de resposta por célula T e B
Alum (sal mineral)	*	**	***	*
AIF (emulsão)	**	-	***	-

Atualmente, o número de adjuvantes licenciados para uso no homem é limitado: i) sais mineirais baseados em alumínio (Alum), ii) o MF59, iii) os virossomos, iv) MPL® (glicolipídeo), v) VLP e vi) toxina de cólera (revisto por REED et al., 2009). Entretanto,

as demais vacinas, pediátricas ou não, cuja composição inclui vírus ou bactérias vivas ou atenuadas contêm algum tipo de “adjuvante natural” presente nestes microrganismos.

As vacinas baseadas em proteínas, embora ofereçam consideráveis vantagens sobre as vacinas tradicionais, em termos de segurança e custo de produção, na maioria dos casos, limitam a imunogenicidade e exigem a adição de adjuvantes para induzir uma resposta protetora e duradoura (revisto por REED et al., 2009).

Infelizmente, as decisões sobre o desenvolvimento de vacinas sobre a adequação de um adjuvante especial e/ ou suas formulações são muitas vezes mal informadas e baseadas apenas em disponibilidade ou conhecimentos técnicos limitados, ao contrário de um processo racional. Esses fatores resultam muitas vezes em testes de vacinas sub-ótimas. Um bom exemplo é a vacina em testes clínicos para malária RTS,S, a qual é baseada em antígeno de circunsporozoíto (CSP) de *P. falciparum,* que quando misturado com Alum mais MPL (AS04) não obteve proteção, enquanto o mesmo antígeno em uma emulsão de óleo em água contendo MPL e QS-21 (AS02) induziu proteção (STOUTE et al., 1997).

A seguir faremos um breve resumo sobre os adjuvantes utilizados neste estudo:

5.1. Adjuvante Completo de Freund - (ACF)

Em 1930 Freund desenvolveu um potente adjuvante composto de uma emulsão água-óleo mineral, surfactante (“mannide monooleate”) contendo micobactérias *Mycobacterium* (*tuberculosis* ou *butyricum*) mortas pelo calor e seca (OPIE; FREUND, 1937). Este adjuvante foi denominado adjuvante completo de Freund. Apesar de

altamente eficaz, o adjuvante Completo de Freund é altamente reatogênico não podendo ser utilizado em seres humanos e sendo desaconselhado para uso mesmo em animais de laboratório.

O ACF é considerado o padrão ouro dentro dos adjuvantes devido a sua capacidade de induzir uma resposta imune extremamente potente. No local da injeção, o ACF induz uma reposta inflamatória crônica que resulta na formação de granulomas, abcessos estéreis, e necrose ulcerativa. De um modo geral, o ACF é amplamente utilizado em ensaio de avaliação da imunogenicidade de antígenos no modelo murino e também na indução de doenças auto imunes (BILLIAU; MATHYS, 2001). Para indução de auto imunidade, evidências indicam que os componentes da micobactéria direcionam os linfócitos T a adquirirem um padrão de resposta do tipo Th1 e que medeiam a hipersensibilidade do tipo tardia (DTH).

Embora não seja aceitável o uso de ACF em humanos, os estudos sobre o modo de ação deste potente adjuvante podem oferecer lições úteis para a concepção de uma vacina (COFFMAN; SHER; SEDER, 2010).

5.2. Adjuvante Incompleto de Freund – (AIF)

O adjuvante incompleto de Freund (AIF) também é uma emulsão água em óleo e difere do ACF por ser composto somente de óleo mineral e surfactante. Na década de 50, o AIF foi utilizado como adjuvante em seres humanos juntamente com o vírus da influenza e foi capaz de induzir títulos de anticorpos de maior magnitude e longevidade se comparado aos títulos dos indivíduos que receberam somente a vacina sem adjuvante (SALK, 1952). Outro ensaio clínico que utilizou esse adjuvante foi a vacina contra a cólera e mostrou que a presença do adjuvante induzia uma proteção mais

duradoura. A principal dúvida em relação à utilização do AIF em seres humanos está relacionada a possíveis efeitos adversos. Um levantamento feito pela WHO mostrou que na imunização de aproximadamente um milhão de indivíduos com AIF, 40 indivíduos apresentaram efeitos adversos locais mais graves, como abcessos estéreis (revisto por MILLER; SAUL; MAHANTY, 2005).

5.3. Hidróxido de Alumínio – (Alum)

Adjuvante base sal de alumínio, referidos genericamente como "Alum", são géis não cristalinos com base em alumínio oxihidróxidos (Conhecido como gel de hidróxido de alumínio), hidroxifosfato de alumínio (conhecido como fosfato de alumínio gel) ou vários sais de propriedade, como hidroxi sulfato de alumínio (revisto por REED et al., 2009).

Esses adjuvantes são componentes de várias vacinas humanas licenciadas, incluindo difteria, tétano, hepatite B (VHB), *Haemophilus* influenza B ou o vírus da poliomielite inativada, hepatite A (VHA), *Streptococcus pneumonia*, meningite e papiloma vírus humanos (HPV) (CLEMENTS; GRIFFITHS, 2002). O Alum também vêm sendo muito utilizado em ensaios clínicos para vacina contra a malária *falciparum*, onde seus resultados indicam que a vacina é segura e imunogênica. Alguns resultados utilizando a proteína *Pf*MSP-3 emulsificada no adjuvante Alum, estão apresentados na tabela 4 da introdução. A formulação é atingida através da adsorção de antígenos com partículas de alumínio altamente carregadas. Dependendo do antígeno, o adjuvante de alumínio adequado é selecionado para manter a imunogenicidade do antígeno e obter o efeito adjuvante máximo.

Os mecanismos de ação dos sais de alumínio citados com freqüência incluem: (i) formação de depósito facilitando a contínua liberação do antígeno, (ii) a formação da estrutura de partículas promove a fagocitose do antígeno por células apresentadoras de antígenos (APC), tais como macrófagos e células B e, (iii) indução da inflamação resultando em recrutamento e ativação de macrófagos, e maior histocompatibilidade do complexo (MHC) classe II, expressão e apresentação de antígenos (ULANOVA et al., 2001; revisto por TRITTO; MOSCA; DE GREGORIO, 2009).

As vantagens dos adjuvantes de alumínio incluem o seu registro de segurança, aumento nas respostas de anticorpos (ou seja, mais rápido, título de anticorpos mais altos, respostas de anticorpos de longa duração), a estabilidade do antígeno e relativa formulação simples para a produção em grande escala (revisto por COFFMAN; SHER; SEDER, 2010). Alum é usado principalmente para melhorar a produção de anticorpos e não utiliza TLR para a sua função *in vivo* (GAVIN et al., 2006). Em humanos, as respostas às proteínas com Alum tendem a ser uma mistura de células Th2 e Th1 (DIDIERLAURENT et al., 2009), porém, em camundongos Alum induz uma resposta celular profundamente polarizada Th2, para quase todos antígenos (revisto por COFFMAN; SHER; SEDER, 2010).

Vacinas contendo Alum não podem ser congeladas porque isso leva a perda de potência. Congelamento acidental é um fenômeno generalizado que ocorre em até 70% das vacinas nos países em desenvolvimento (BURGESS; MCLNTYRE, 1999).

5.4. TiterMax

Constituído de uma micropartícula de água em óleo, o adjuvante TiterMax Gold possui três ingredientes essenciais, uma propriedade bloco copolímero LCR-8941, esqualeno (um óleo metabolizável), e uma única micropartícula estabilizadora. TiterMax Gold ajuda na apresentação de antígenos ao sistema imunológico, sem os efeitos tóxicos de ACF (BENNETT et al., 1992).

5.5. Quil A

É um produto da fração da casca da àrvore *Quillaja saponaria* (KENSIL, 1996). Composto de uma mistura heterogênea de glicosídeos triterpênicos, que variam em sua atividade adjuvante e toxicidade. Saponinas têm sido amplamente utilizadas como adjuvantes em vacinas veterinárias. Saponinas (Quil-A, ISCOM, QS-21) (também incluída no AS02 e AS01) (revisto por REED et al., 2009).

5.6. CpG ODN

O CpG ODN é um oligodeoxinucleotídeo sintético não metilado (citidina fosfato guanosina) composto de motivos CG inseridos em contextos restritos de base e que agem em receptores específicos de cada espécie. Estudos mostraram que ocorrre uma interação entre os dinucleotídeos não metilados CpG e o TLR9 resultando na ativação de fatores de transcrição (revisto por COFFMAN; SHER; SEDER, 2010). A molécula de TLR9 murina é ativada preferencialmente pelo motivo GACGTT enquanto que a seqüência ideal para a molécula de TLR9 humana é GTCGTT (revisto por KRIEG,

2003). Geralmente, o CpG ODN é sintetizado com 8-30 bases, contém um ou mais motivos CpG e pode ser classificado como tipo A ou B. O CpG ODN tipo “A” possui uma cauda poli G, a ligação entre as bases na região central é fosfodiéster e no resto da seqüência é fosforotioato (a fim de evitar a degradação pelas nucleases celulares presentes no soro). Trabalhos na literatura mostraram que o CpG ODN do tipo A é um forte indutor da maturação e produção de IFN-α pelas células dendríticas e capaz de ativar *células NK*. As vacinas contra raiva, caxumba, sarampo e rubéola quando emulsificadas em CpG ODN do tipo A alcançam resultados mais satisfatórios em comparação com a vacina quando testada isoladamente (revisto por DE VRIES et al., 2011). O CpG ODN do tipo “B” que possui toda a seqüência em fosforotioato, estimula a proliferação e produção de IL-6 e IgM pelos linfócitos B, maturação e produção de IL-6 e TNF-α pelas células dendríticas (HEMMI et al., 2003; KLINMAN, 2004). Um exemplo de CpG ODN do tipo B que vem sendo bastante utilizado em estudos de imunização em camundongos, o qual foi utilizado em nosso estudo, é o 1826 que possui a seqüência: TCCATGACGTTCCTGACGTT.

Foi demonstrado em animais que a administração de CpG ODN induz uma potente resposta inata do tipo Th1 que confere imunidade protetora contra vários patógenos (DITTMER; OLBRICH, 2003; revisto por COFFMAN; SHER; SEDER, 2010).

Em ensaios clínicos foi constatado que após a vacinação profilática contra hepatite B, meningite, tuberculose e BCG a imunidade antígeno específica é reforçada na presença de CpG ODN do tipo B em comparação com a vacina quando testada isoladamente (ANGEL et al., 2008; revisto por DE VRIES et al., 2011).

5.7. Flagelina (*Salmonella typhimurium)* – (FliC)

Flagelina é um adjuvante potente que aumenta a resposta imune adaptável para uma variedade de antígenos. Ao utilizar flagelina como adjuvante com um ou mais antígenos recombinantes, respostas protetoras dependentes de anticorpos foram obtidas contra uma variedade de patógenos, incluindo o vírus da gripe (APPLEQUIST et al., 2005; HULEATT et al., 2008), *Yersinia pestis* (HONKO et al., 2006; MIZEL et al., 2009) e *Pseudomonas aeruginosa* (WEIMER et al., 2009). Essas respostas protetoras apresentaram títulos altos de IgG antígeno-específico quando a vacina foi administrada por via nasal ou intramuscular (MIZEL et al., 2009). Embora flagelina possa ser um adjuvante quando misturado com antígenos, a aplicação atual é principalmente pela geração da fusão de antígenos recombinantes a flagelina (HULEATT et al., 2007; BARGIERI et al., 2008; BARGIERI et al., 2010).

A observação de que a flagelina, um agonista de TLR5 (HAYASHI et al., 2001), é um polipeptídeo abriu a possibilidade de que as células eucarióticas podem ser capazes de produzir essa molécula. Flagelina de *Salmonella* (chamada FliC) é uma proteína de subunidade monomérica, que polimeriza para formar flagelos bacterianos. Ela tem sido extensivamente estudada, e as regiões e resíduos de flagelina que são necessárias para a interação ao TLR5 foram definidas (SMITH et al., 2003). FliC ativa citocinas pró-inflamatórias, produção e recrutamento de granulócitos polimorfonucleares em pulmão (LIAUDET et al., 2003) e epitélio intestinal (YU et al., 2003). Ela ativa macrófagos para a produção de mediadores inflamatórios (MIZEL et al., 2003), monócitos humanos para a produção de TNF-α (MCDERMOTT et al., 2000) bem como induz células dendríticas para monócitos para amadurecer e regular moléculas (MEANS et al., 2003) e produzir IL-10, IL-6, TNF-α e IL-12p70, mas pouco IL-5 e IL-13

(AGRAWAL et al., 2003). Isso sugere que FliC pode induzir respostas do tipo Th1. No entanto, em determinadas situações, a indução da resposta Th2, também têm sido observada (DIDIERLAURENT et al., 2004; CUNNINGHAM et al., 2004). Tomados em conjunto, estas observações demonstram que FliC induz resposta imune inflamatória típica de ativação de TLR (revisto por BARGIERI et al., 2011).

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Estudar a imunogenicidade das proteínas recombinantes MSP-3α e MSP-3β de *P. vivax*, quando administradas em camundongos na presença de diferentes adjuvantes.

2. Objetivos Específicos

2.1 Expressar e purificar as proteínas recombinantes MSP-3α (C-terminal) e MSP-3β (N e C-terminal, proteína inteira) a partir de *E. coli*;

2.2 Avaliar comparativamente a resposta imune humoral (anticorpos IgG e subclasses de IgG) induzida em camundongos após imunização com as proteínas MSP-3α e MSP-3β na presença de Adjuvante Completo de Freund (ACF)/Adjuvante Incompleto de Freund (AIF);

2.3 Analisar a resposta de anticorpos IgG induzida em camundongos após imunização com domínios selecionados das proteínas MSP-3α e MSP-3β na presença de diferentes adjuvantes que possam ser utilizados posteriormente em imunizações pré-clínicas em primatas não humanos;

2.4 Verificar se soros de camundongos imunizados com as proteínas MSP-3α e MSP-3β reconhecem a proteína nativa expressa em merozoítos de *P. vivax.*

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Composição das soluções, tampões e meios de cultura utilizados

1.1 Soluções e tampões para eletroforese de proteínas (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: 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.

1.2 Meios para cultura de bactérias

LB (Luria Bertani): 2% LB broth base (Invitrogen); 0,5% NaCl (Synth) pH 7,0.

LB-cloranfenicol: 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).

1.3 Tampões utilizados para obtenção das proteínas MSP-3α (FP-1), MSP-3β (FP-1, FP-2 e FP-3) a partir do sobrenadante dos extratos bacterianos

Tampões	Composição
Tampão de lise	57,5 mM Tampão Fosfato de Sódio; 128,7 mM NaCl; 10 mg/mL Lisozima; 1 mM PMSF; pH final 7,0
Tampão de equilíbrio (cromatografia de afinidade)	57,5 mM Fosfato de Sódio; 128,7 mM NaCl; 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; 5128,7 mM NaCl; 10% Glicerol; 0 – 400 mM Imidazol; pH final 6,0
Tampão de diálise para estoque da proteína	PBS; 1 mM PMSF

1.4 Soluções e tampões para ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

Tampão para sensibilização das placas: Tampão Carbonato [0,795g carbonato de sódio (Na_2CO_3), 1,465g bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) para 500mL, 0,05 M (Synth), 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 $C_6H_8O_7$ (Synth) pH final 4,5-5,0.

Solução de bloqueio:

i) Para ensaios com soros de camundongos: PBS, 5% de leite em pó desnatado (Molico®), 2,5% de BSA (Sigma).

Solução para diluição de amostra

i) Para ensaios de detecção de anticorpos: PBS, 5% de 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.

2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.

As proteínas recombinantes MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-1 e FP-2) foram produzidas previamente em bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21 (DE3, Novagen), foram obtidas de forma solúvel e purificadas por cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel Ni Sepharose™ High Performance (GE Healthcare) (JIMENEZ et al., 2008). As frações eluídas foram posteriormente filtradas em membrana de 0,22 μm, e as proteínas recombinante foram purificadas por cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q (Amersham Biosciences), acoplada ao sistema ÄKTA™prime (Amersham Biosciences).

Por outro lado, a proteína recombinante *Pv*MSP-3β (FP-3) foi produzida a partir da linhagem Rosetta (Novagen). Resumidamente as bactérias recombinantes foram

cultivadas em meio LB-ampicilina-cloranfenicol (LB-amp, 100 µg/mL; LB-cloranfenicol 35 µg/mL) overnight a 37°C. A seguir, a cultura foi diluída (1:50) em LB-amp-cloranfenicol e incubada a 37°C, sob agitação a 200 rpm até atingir uma DO_{600} entre 0.6-0.8. As bactérias foram então induzidas pela adição de 0,1 mM de isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG, Invitrogen) por 4h a 37ºC. Após este período, a cultura bacteriana foi precipitada por centrifugação (3.500 rpm/ 15 min/ 4°C) e ressuspendida em tampão de lise. As bactérias foram lisadas em banho de gelo com auxílio de um sonicador (4 ciclos de 3 minutos, em pulso constante, e intervalos de 1 minuto entre os pulsos). Em seguida, o extrato bacteriano foi centrifugado (15.000 rpm/ 30 minutos/ 4°C) e as frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE 12%.

O sobrenadante obtido foi purificado por cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel, previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio. Em seguida, a resina foi lavada com o tampão de lavagem e submetida a um gradiente linear de imidazol (0 a 400 mM) em tampão de eluição. Durante a passagem de cada tampão pela resina, as respectivas alíquotas foram recuperadas e analisadas por SDS-PAGE 12%. As frações contendo a proteína foram reunidas e dialisadas contra o tampão de equilíbrio, durante a noite, sob constante agitação, a 4°C. Após a diálise essa fração foi novamente purificada por cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel. As frações contendo a proteína foram reunidas e dialisadas contra PBS contendo 0,1M de Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, SIGMA), durante a noite, sob constante agitação, a 4°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford. As figuras 4 e 5 apresentam a representação esquemática da localização das proteínas recombinantes que foram utilizadas neste estudo.

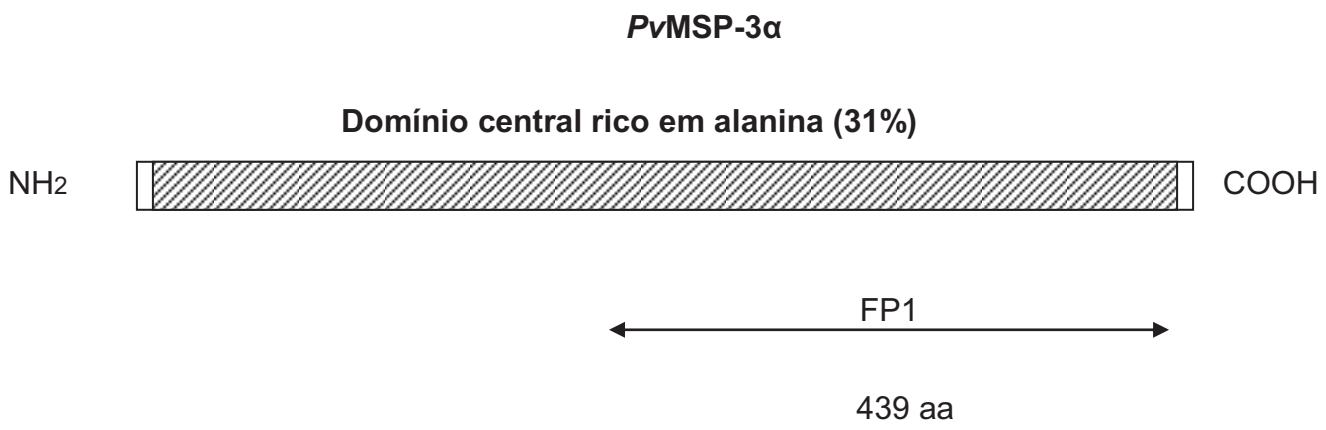

Figura 4. Representação esquemática da proteína recombinante MSP-3α (FP-1) em relação à proteína inteira. A linha abaixo representa a posição da MSP-3α que foi expressa como proteína recombinante.

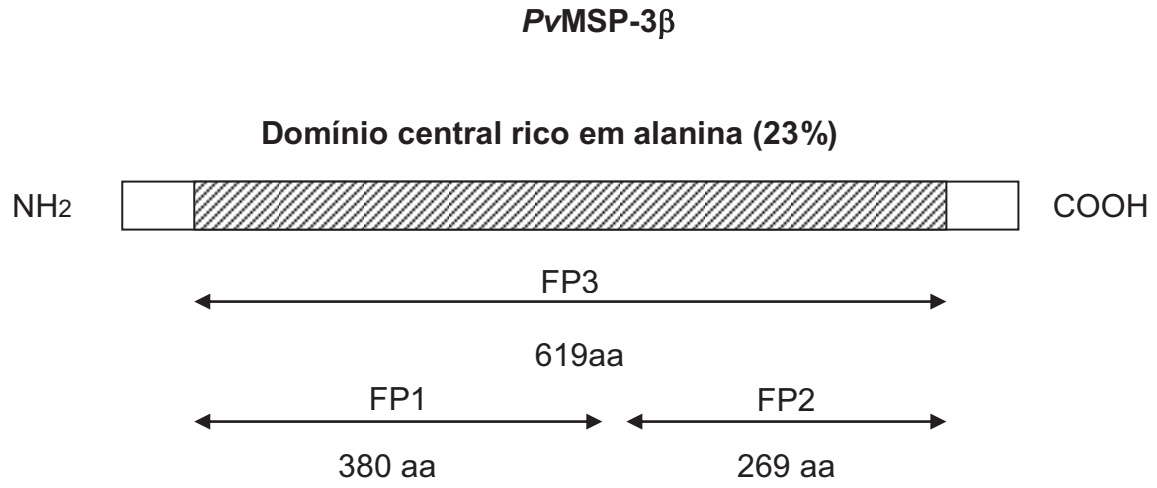

Figura 5. Representação esquemática das proteínas recombinantes baseadas na MSP-3β (FP-1, FP-2 e FP-3). A área destacada representa a região da MSP-3β que foi expressa como proteína recombinante, ▨. As linhas abaixo representam a posição das três proteínas recombinantes geradas (FP-1, FP-2 e FP-3).

3. Adjuvantes.

Os adjuvantes que foram testados neste projeto são: 1) Adjuvante Completo de Freund - ACF (Sigma), 2) Adjuvante Incompleto de Freund - AIF (Sigma), 3) Hidróxido de Alumínio - Alum (Pierce Thermo scientific), 4) TiterMax (Sigma), 5) CpG

ODN 1826 (TCCATGACGTTCCTGACGTT), IDT (Integrated DNA Technologies), 6) Quil A (Superfos Biosector, Vedbaek, Denmark), 7) Flagelina - FliC (*Salmonella typhimurium).* Este último foi fornecido pelo Dr. Luís Carlos Ferreira do Departamento de Microbiologia, ICB/USP.

Para as imunizações de camundongos BALB/c os adjuvantes foram utilizados nas seguintes quantidades: ACF/AIF (1:2), Alum (25 µg/dose), Quil A (25 µg/dose), CpG ODN 1826 (10 µg/dose), TiterMax Gold (1:2 somente na primeira dose), FliC (2,5 µg/dose). O adjuvante Alum, após a preparação da emulsão, permaneceu sob agitação por aproximadamente 2 horas antes da imunização.

4. Imunizações experimentais.

Grupos de 6 camundongos isogênicos BALB/c fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas, procedentes do Biotério da FCF-IQ/USP foram usados para os experimentos de imunização com as proteínas recombinantes. Cada animal recebeu 3 doses, sendo cada uma de 10 µg de proteína recombinante num volume final de 0,1 mL com intervalo de 15 dias. A imunização foi feita por via subcutânea (s.c.) nas duas patas traseiras (1ª dose) ou base da cauda (doses subseqüentes), com o antígeno emulsificado nos adjuvantes descritos acima, individualmente, ou em combinação (Alum + CpG ODN 1826 e FliC + CpG-ODN 1826). Os animais do grupo controle foram imunizados somente com o diluente em adjuvante. No caso do adjuvante TiterMax, cada camundongo foi imunizado somente uma vez (1ª dose) com o antígeno emulsificado neste adjuvante. Nas doses subseqüentes, os camundongos receberam somente o antígeno em diluente. A imunização foi feita pela via s.c. sendo que 25 µL da emulsão foi injetado em cada uma das 4 patas por

sugestão do fabricante. Os animais do grupo controle receberam o adjuvante diluído em PBS na primeira dose, nas doses subseqüentes, os camundongos receberam apenas PBS. As coletas de sangue foram feitas pela base da cauda 14 dias depois de cada imunização e os soros foram separados e estocados a - 20°C até a utilização. Os soros obtidos foram avaliados por ELISA quanto ao reconhecimento das proteínas por anticorpos IgG e isotipos de IgG (IgG1, IgG2a e IgG2b).

Os camundongos C57BL/6 (TLR4 *KO* e *Wild Type*) foram obtidos junto ao CEDEME/UNIFESP.

Este projeto foi aprovado pela comissão de Ética em Experimentação animal da FCF/USP em 10/07/2006.

5. Ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-MSP-3α e anti-MSP-3β em camundongos imunizados.

Os títulos de anticorpos IgG específicos contra a proteína homóloga foram determinados por ELISA de acordo como descrito anteriormente (MÚFALO et al., 2008; GENTIL et al., 2010). Placas de 96 poços ("high binding", Costar 3590) foram sensibilizadas com 2 µg/mL de cada uma das proteínas homólogas em tampão carbonato em um volume final de 50 µL/poço e incubadas durante a noite em temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween e, em seguida, foi adicionado 200 µL/poço da solução de bloqueio. Após incubação a 37°C por 2 horas, foi adicionado 50 µL/poço de cada um dos soros diluídos a partir de 1:100 em solução de bloqueio e uma nova incubação foi realizada por mais 1 hora à temperatura ambiente. Após nova etapa de lavagem das placas com PBS-Tween, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo secundário

conjugado a peroxidase (IgG de cabra anti-IgG de camundongo, KPL) diluído em solução de bloqueio. Em seguida, outra incubação foi realizada por 1 hora à temperatura ambiente com posterior lavagem com PBS-Tween por 3 vezes. A revelação foi feita pela adição de 100 µL/poço da solução de revelação. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de uma solução contendo H_2SO_4 4N. Títulos específicos anti-MSP-3 foram definidos como a maior diluição com uma DO_{492} superior a 0,1, a qual foi determinada em um leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA). A detecção de anticorpos IgG1, IgG2a e IgG2b anti-MSP-3 em camundongos imunizados foi realizada como descrito acima, exceto que o anticorpo secundário foi substituído por anticorpos isotipo-específicos de camundongo (anti-IgG1, IgG2a e IgG2b) conjugados a peroxidase (Southern Technologies) em uma diluição de 1:8000. Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos em $\log_{10} \pm$ erro padrão da média (SEM).

6. Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) foi realizado em lâmina de 10 poços com esquizontes de *P. vivax* enriquecidos em Percoll® (Amershan), como descrito em LJUNGSTRÖM et al., 2004. Amostras de sangue (5-10 mL) foram coletadas, em tubos com heparina, de pacientes residentes em Manaus, AM, Brasil. Todos os pacientes foram devidamente informados e tal procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A preparação das lâminas foi realizada em Manaus (FIOCRUZ) pela aluna do Prof. Fábio T. M. Costa, Juliana Leite (IB/UNICAMP). Resumidamente, após descartar o

plasma, as células vermelhas foram lavadas 3 vezes e ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Sigma) para um hematócrito de 10%. A suspensão celular foi distribuída em tubos de 15mL (5mL em cada tubo) com Percoll® (45%). Após centrifugação, eritrócitos enriquecidos, infectados com as formas maduras, foram coletados do sobrenadante, lavados e ressuspendidos em 10% de Soro Bovino Fetal. Eritrócitos infectados foram adicionados à lâmina de Imunofluorescência, posteriormente fixados por 10 minutos em acetona e secos ao ar livre. Um "pool" de soros dos camundongos imunizados com as proteínas MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-1, FP-2 e FP-3) na presença de ACF/AIF, foi diluído em PBS 1:50, aplicados na lâmina e incubados por 30 minutos, em ambiente úmido a 37 ºC. A lâmina foi excessivamente lavada com PBS e então incubada com 10 μg/mL de FITC (anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo marcado com fluoresceína) (Sigma) e 100 μg/mL de DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Molecular Probes) por 30 minutos em ambiente úmido a 37 ºC. Após diversas lavagens com PBS a lâmina foi selada com lamínula e avaliada em microscópio de imunofluorescência.

Para sinalizar os parasitos, utilizamos o reagente DAPI o qual é capaz de corar material nuclear em azul. Como controle negativo, empregamos o uso do soro de camundongos imunizados apenas com o adjuvante ACF/AIF e como controle positivo o anticorpo monoclonal anti-MSP-1_{19} K23 (BARGIERI et al., 2008; CARVALHO et al., 2010).

7. Análise estatística

A análise estatística foi determinada, através do programa GraphPad PRISM 4 (média do grupo 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. Obtenção das proteínas recombinantes baseadas na MSP-3α e MSP-3β de *P. vivax.*

Antes de darmos início as imunizações de camundongos, as proteínas recombinantes correspondentes à MSP-3α e MSP-3β de *P. vivax* foram analisadas em SDS-PAGE 12%, na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol (2-ME), conforme apresentado na figura 6. Em geral as proteínas migram com um padrão de única banda em nível satisfatório de pureza.

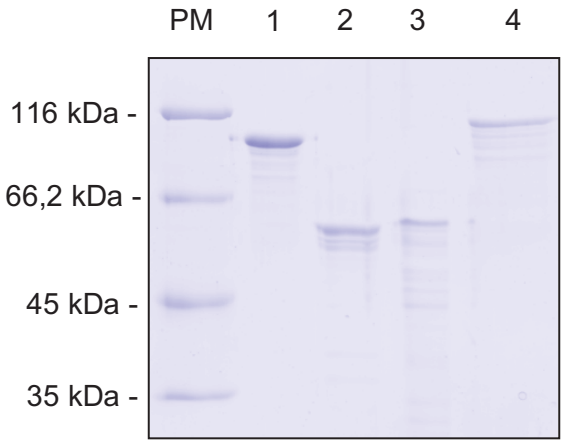

Figura 6. Análise em SDS-PAGE 12% das proteínas recombinantes purificadas correspondentes à MSP-3α e MSP-3β de *P. vivax.* Os números de 1 a 4 estão representando as seguintes proteínas, 1: MSP-3α (FP-1) - 87 kDa, 2: MSP-3β (FP-1) (N-terminal) - 60 kDa, 3: MSP-3β (FP-2) (C-terminal) - 57 kDa, 4: MSP-3β (FP-3) - 104 kDa.

2. Análise comparativa da imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas na MSP-3α e MSP-3β em camundongos BALB/c, na presença de adjuvante de Freund

Inicialmente, a imunogenicidade das proteínas MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-1, FP-2 e FP-3) foi avaliada em camundongos BALB/c na presença de um adjuvante forte (ACF/AIF), como descrito no item 3 da metodologia. Os soros dos animais foram testados por ELISA quanto a presença de anticorpos IgG contra as proteínas

homólogas, 2 semanas após cada imunização. Os resultados estão expressos como médias de títulos de IgG (log_{10}) ± SEM. Os resultados obtidos com os diferentes grupos, após cada dose de imunização, foram comparados estatisticamente usando ANOVA one-way e os valores de *P* estão apresentados na tabela A.1 (em anexo). Não estão incluídos nessa análise os grupos controles (imunizado somente com adjuvante) uma vez que os mesmos não apresentaram resposta de anticorpos para os antígenos em questão.

Ao comparar a imunogenicidade em camundongos utilizando as proteínas MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-1, FP-2 e FP-3), na presença de ACF/AIF, observamos que após a primeira dose os animais imunizados com as proteínas MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-1) apresentaram uma resposta de anticorpos IgG significativamente mais alta em relação aos grupos imunizados com as proteínas MSP-3β (FP-2 e FP-3) ($P<0,001$). Porém, a partir da segunda dose, os camundongos imunizados com as proteínas FP-2 e FP-3 (MSP-3β) apresentaram títulos de IgG mais altos ($P<0,001$ comparação da primeira para a segunda dose dos dois grupos) e, após a terceira dose, não foi encontrada diferença significativa entre os diferentes grupos ($P>0,05$) conforme representado na figura 7. Esses resultados demonstram que, após 3 doses, todas as proteínas testadas foram imunogênicas em camundongos na presença de um adjuvante forte, o qual é inapropriado para futuros testes pré-clínicos em macacos.

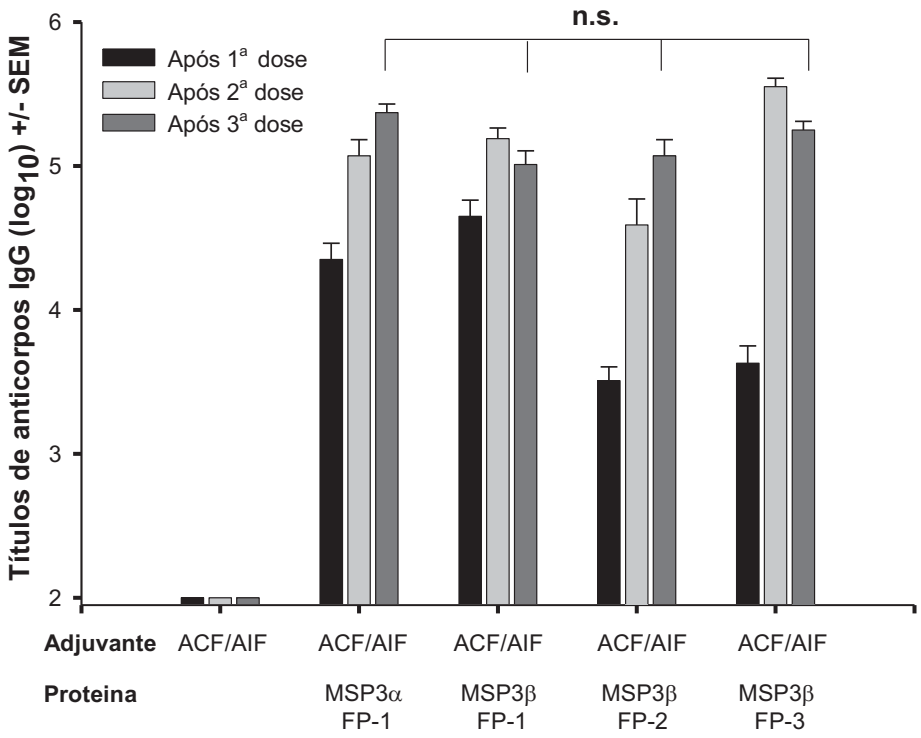

Figura 7. Avaliação comparativa da resposta de anticorpos IgG induzida em camundongos BALB/c após a imunização com as proteínas recombinantes MSP-3α (FP-1), MSP-3β (FP-1), MSP-3β (FP-2) e MSP-3β (FP-3). A imunização foi feita por via subcutânea com o antígeno na presença de ACF/AIF. Os animais do grupo controle foram imunizados somente com o diluente em adjuvante. Os soros foram coletados duas semanas após cada dose e testados quanto ao reconhecimento por anticorpos de IgG.

Ao final do esquema de imunizações (3 doses), os títulos de isotipos de IgG foram avaliados. A análise dos resultados demonstrou um predomínio de IgG1, IgG2a e IgG2b caracterizando um padrão de resposta mista Th1/Th2 em todos os grupos testados. A tabela 7 ilustra comparativamente a magnitude da resposta de isotipos de IgG induzidos após imunização com as diferentes proteínas.

Tabela 7 - Avaliação da resposta de isotipos de IgG anti-*Pv*MSP-3 nos soros de camundongos imunizados com proteínas recombinantes MSP-3α (FP-1), MSP-3β (FP-1), MSP-3β (FP-2) e MSP-3β (FP-3).

	Média dos títulos			
Proteínas	**IgG1**	**IgG2a**	**IgG2b**	**Razão IgG1/IgG2a**
MSP-3α (FP-1)	4.076.800	577.866,67	408.000	7,05
MSP-3β (FP-1)	4.076.800	119.466,67	238.133,33	34,12
MSP-3β (FP-2)	3.397.333	699.333,33	849.333,33	4,86
MSP-3β (FP-3)	4.076.800	526.666,67	849.333,33	7,74

3. Análise comparativa da imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas na MSP-3α e MSP-3β em camundongos C57BL/6 TLR4 *KO* e *Wild Type*, na ausência de adjuvantes

Com o objetivo de verificar se uma possível contaminação das proteínas em estudo por LPS estaria interferindo em nossos resultados, realizamos imunização de camundongos C57BL/6 TLR4 *KO* e *Wild Type* com cada uma das proteínas, na ausência de adjuvantes. Os soros dos animais foram testados por ELISA quanto a presença de anticorpos IgG contra as proteínas homólogas, 2 semanas após cada imunização. Os resultados estão expressos como médias de títulos de IgG (log_{10}) ± SEM (Figura 8) e foram comparados estatisticamente usando ANOVA one-way. Na tabela A.2 (em anexo) estão apresentados os valores de *P* obtidos. A análise comparativa dos resultados desse experimento demonstra que a proteína MSP-3β (FP-3) tem uma propriedade intrínseca adjuvante que é independente do TLR4 e que todas as proteínas estão livres da contaminação por LPS, com exceção da proteína MSP-3β (FP-2) que induziu níveis de anticorpos com diferença significativa entre os dois grupos de animais testados, somente após a terceira dose ($P<0,05$).

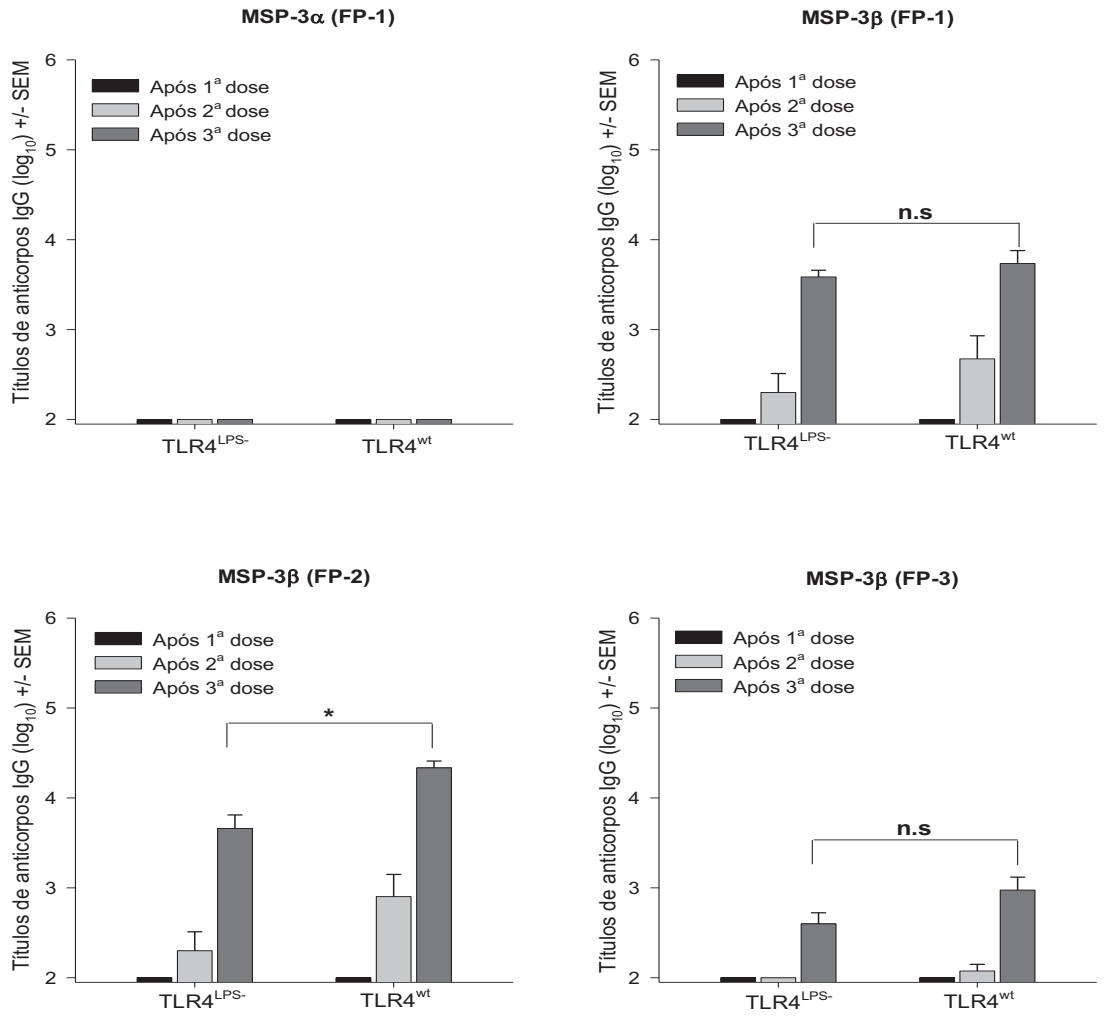

Figura 8. Avaliação comparativa da resposta de anticorpos IgG induzida em camundongos C57BL/6 TLR4 *KO* e *Wild Type* imunizados com cada uma das proteínas, na ausência de adjuvantes. Os animais foram imunizados com três doses contendo 10 µg de cada proteína recombinante. Os resultados estão expressos como média dos títulos de anticorpos de cada grupo em escala logarítmica (log_{10}) +/- erro padrão da média (SEM).

4. Imunizações pré-clínicas em camundongos BALB/c com os domínios selecionados das proteínas MSP-3α e MSP-3β na presença de diferentes adjuvantes

Após demonstrarmos que todas as proteínas recombinantes foram imunogênicas em camundongos na presença de ACF/AIF, selecionamos as proteínas MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-3) para serem testadas na presença de diferentes adjuvantes, uma vez que o ACF não pode ser usado no homem e é usado com restrições em animais de experimentação. A imunogenicidade destas proteínas recombinantes foi avaliada em camundongos BALB/c, utilizando como adjuvante agonistas de TLR [FliC flagelina de *Salmonella Typhimurium* (TLR5) e CpG-ODN 1826 (TLR9)] ou adjuvantes convencionais, tais como hidróxido de alumínio, saponinas, TiterMax e AIF. Os anticorpos IgG foram determinados por ELISA nos soros de camundongos, duas semanas depois de cada dose de imunização. As formulações testadas estão descritas no item 2 da metodologia.

Pode-se observar na figura 9 que após a terceira dose os animais imunizados com a proteína recombinante MSP-3α (FP-1) na presença de diferentes adjuvantes geraram altos títulos de IgG total. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos imunizados na presença dos adjuvantes AIF, TiterMax e Quil A ($P>0,05$). Por outro lado, os títulos de IgG dos grupos imunizados na presença dos adjuvantes Alum, FliC e CpG ODN 1826 foram significativamente mais baixos quando comparados ao grupo do adjuvante AIF ($P<0,001$ em todos os casos).

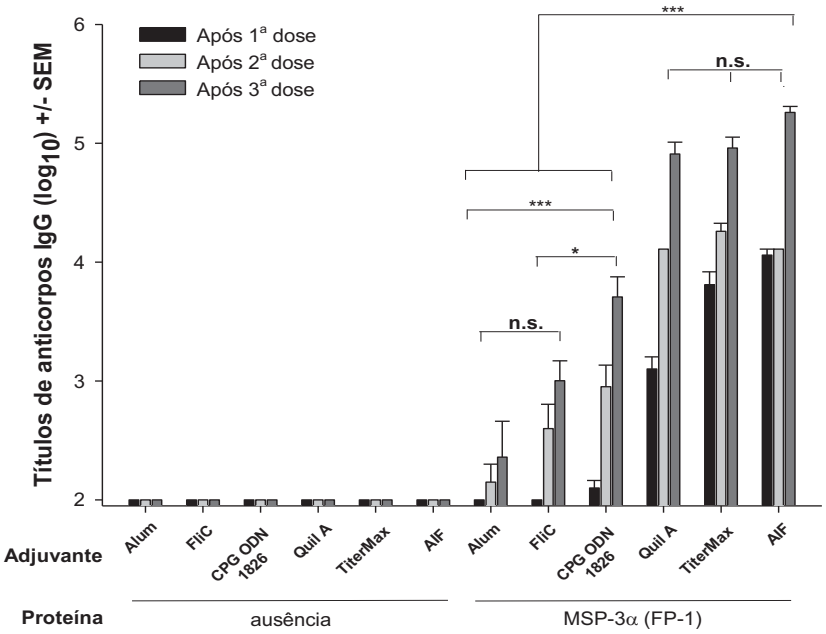

Figura 9. Efeito da imunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante MSP-3α (FP-1) na presença de diferentes adjuvantes. A imunização foi feita por via subcutânea com o antígeno na presença de diferentes adjuvantes. Os animais do grupo controle foram imunizados somente com o diluente em adjuvante. Os resultados estão expressos em $\log_{10}$ +/- SEM dos títulos de anticorpos anti-*Pv*MSP-3 [ns = não significativo P>0,05, (*) = P<0,05, (**) = P< 0,01 e (***) = P<0,001].

Na figura 10, podemos observar que a resposta de anticorpos IgG induzida em camundongos com a proteína MSP-3β (FP-3) na presença de diferentes adjuvantes geraram altos títulos de IgG total. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos imunizados na presença dos adjuvantes AIF, TiterMax e Quil A (P>0,05). Por outro lado, os títulos de IgG dos grupos imunizados na presença dos adjuvantes Alum, FliC e CpG ODN 1826 foram significativamente mais baixos quando comparados ao grupo do adjuvante AIF. Alum e FliC (P<0,001) e CpG (P <0,05).

Nas tabelas A.3 e A.4 (em anexo) estão apresentados os resultados dos valores de *P* obtidos pela comparação entre os títulos de anticorpos obtidos dos diferentes grupos de animais (ANOVA), após cada imunização. Não estão incluídos

nessa análise os grupos controles (imunizados somente com adjuvante) uma vez que não apresentaram resposta de anticorpos para o antígeno em questão.

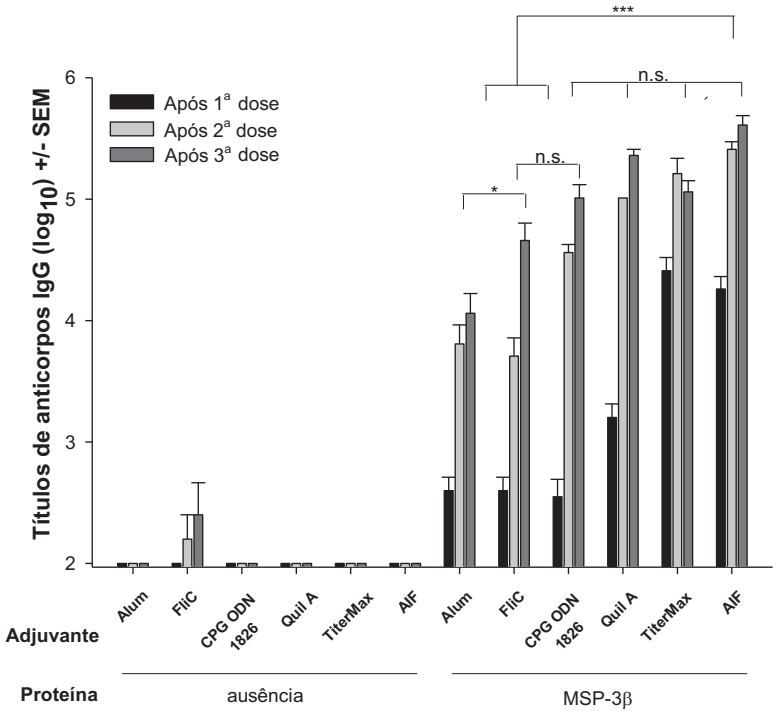

Figura 10. Efeito da imunização em camundongos BALB/c com a proteína recombinante MSP-3β (FP-3) na presença de diferentes adjuvantes. A imunização foi feita por via subcutânea com o antígeno na presença de diferentes adjuvantes. Os animais do grupo controle foram imunizados somente com o diluente em adjuvante. Os resultados estão expressos em $\log_{10}$ +/- SEM dos títulos de anticorpos anti-*Pv*MSP-3 [ns = não significativo P>0,05, (*) = P<0,05, (**) = P< 0,01 e (***) = P<0,001].

Posteriormente foram avaliados a presença de isotipos de IgG para os domínios selecionados da MSP-3 [MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-3)] após o esquema de imunizações. A análise dos isotipos de IgG demonstrou um predomínio de IgG1, IgG2a e IgG2b caracterizando um padrão de resposta mista Th1/Th2 para a maioria dos grupos testados, exceto para a proteína MSP-3α (FP-1) na presença dos adjuvantes Alum, FliC e Quil A (tabela 8) e para proteína MSP-3β (FP-3) na presença do adjuvante Alum (tabela 9) que demonstrou um predomínio de IgG1 caracterizando um padrão de resposta Th2. Os adjuvantes Alum e FliC são indutores de resposta do tipo Th2, o que pode ser comprovado pelos altos títulos de

IgG1 detectados. As tabelas 8 e 9 ilustram comparativamente a magnitude da resposta de anticorpos induzidos nos animais imunizados.

Tabela 8 - Avaliação da resposta de anticorpos de isotipos de IgG anti-*Pv*MSP-3 nos soros de camundongos imunizados com a proteína recombinante MSP-3α (FP-1) na presença dos diferentes adjuvantes testados.

Média dos títulos				
Adjuvantes	**IgG1**	**IgG2a**	**IgG2b**	**Razão IgG1/IgG2a**
Alum	3.333,33	100	166,67	33,33
FliC	10.666,67	600	800	17,78
CPG-ODN 1826	29.866,67	6.666,67	1.866,67	4,48
Quil A	1.092.266,67	85.333,33	68.266,67	12,80
TiterMax	273.066,67	324.266,67	256	0,84
AIF	562.517,33	375.466,67	136.533,33	1,50

Tabela 9 - Avaliação da resposta de anticorpos de isotipos de IgG anti-*Pv*MSP-3 nos soros de camundongos imunizados com a proteína recombinante MSP-3β (FP-3) na presença dos diferentes adjuvantes testados.

Média dos títulos				
Adjuvantes	**IgG1**	**IgG2a**	**IgG2b**	**Razão IgG1/IgG2a**
Alum	62.933,33	533,33	866,67	118
FliC	88.000	2.666,67	3.466,67	33
CPG-ODN 1826	4.933,33	22.400	3.333,33	0,22
Quil A	85.333,33	36.266,67	192	2,35
TiterMax	1.143.466,67	53.866,67	544	21,23
AIF	1.809.066,67	93.866,67	85.333,33	19,27

5. Imunizações pré-clínicas com o domínio selecionado da proteína MSP-3β na presença de diferentes combinações de adjuvantes

Após demonstrarmos que a proteína recombinante MSP-3β (FP-3) foi imunogênica em camundongos na presença dos diferentes adjuvantes testados, selecionamos essa proteína para ser testada de forma combinada com os adjuvantes CpG ODN 1826 + FliC e CpG ODN 1826 + Alum, com o objetivo de avaliar se o CPG-ODN 1826 poderia melhorar a eficiência de Alum ou FliC. Neste experimento (Figura 11), observamos que as formulações combinadas foram capazes de induzir títulos de anticorpos IgG estatisticamente mais altos ($P<0,001$ nos dois casos) do que os grupos que receberam apenas a proteína emulsificada em um único adjuvante (Alum ou FliC).

Na tabela A.5 (em anexo) estão apresentados os resultados dos valores de *P* após a comparação entre os títulos de anticorpos obtidos dos diferentes grupos de animais (ANOVA), após cada imunização. Não estão incluídos nessa análise os grupos controles (imunizados somente com adjuvante) uma vez que não apresentaram resposta de anticorpos para o antígeno em questão.

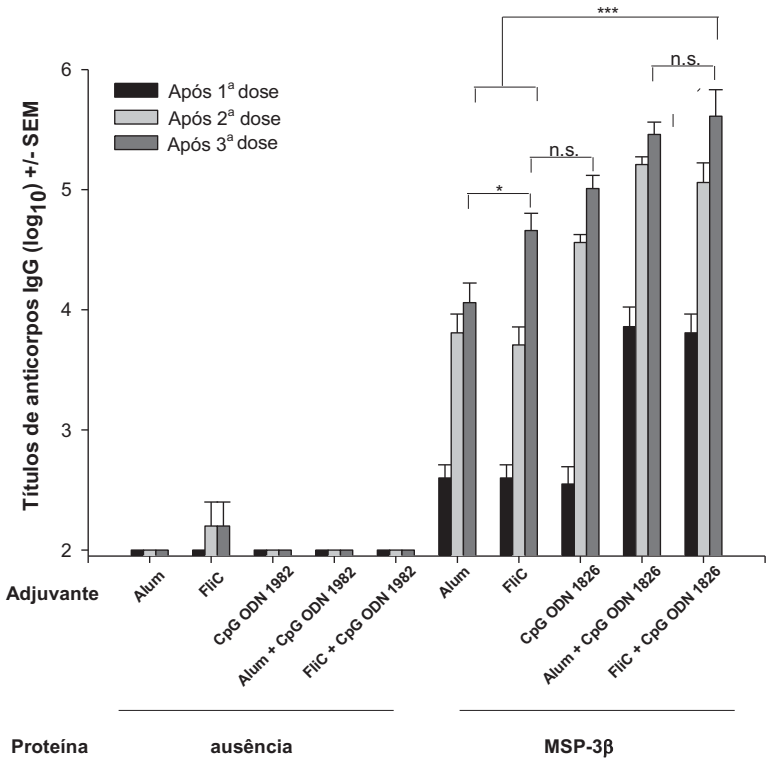

Figura 11. Avaliação da resposta de anticorpos IgG anti-MSP-3 nos soros de camundongos imunizados com a proteína recombinante MSP-3β (FP-3) na presença das diferentes combinações de adjuvantes. A imunização foi feita por via subcutânea com o antígeno na presença das diferentes combinações de adjuvantes. Os soros foram coletados duas semanas após cada dose e testados quanto ao reconhecimento por anticorpos de IgG. Os resultados estão expressos em $\log_{10}$ +/- SEM dos títulos de anticorpos anti-MSP-3 [ns = não significativo P>0,05, (*) = P<0,05, (**) = P< 0,01 e (***) = P<0,001].

Com o objetivo de avaliar se o CpG ODN 1826 seria capaz de balancear a resposta de isotipos de IgG induzida pelas proteínas na presença dos adjuvantes Alum e FliC, determinamos avaliar a presença de isotipos de IgG para a proteína MSP-3β (FP-3) quando administrada em combinação com os adjuvantes (CpG ODN 1826 + Alum e CpG ODN 1826 + FliC). A análise dos isotipos de IgG demonstrou que quando os adjuvantes Alum e FliC são administrados em combinação com o adjuvante CpG ODN 1826 ocorre um aumento do isotipo IgG2a, caracterizando um padrão de resposta Th1. A tabela 10 ilustra comparativamente a magnitude da resposta de anticorpos induzidos nos animais imunizados.

Tabela 10 - Avaliação da resposta de anticorpos de isotipos de IgG anti-*Pv*MSP-3 nos soros de camundongos imunizados com a proteína recombinante MSP-3β (FP-3) na presença das diferentes combinações de adjuvantes testados.

	Média dos títulos			
Adjuvantes	**IgG1**	**IgG2a**	**IgG2b**	**Razão IgG1/IgG2a**
Alum	62.933,33	533,33	866,67	118
FliC	88.000	2.666,67	3.466,67	33
CPG-ODN 1826	4.933,33	22.400	3.333,33	0,22
Alum + CpG ODN 1826	18.133,33	36.266,67	11.733,33	0,50
FliC + CpG ODN 1826	100.266,67	112.000	768	0,90

A fim de avaliar se anticorpos anti-MSP3β (FP-3) reconhecem preferencialmente alguns dos fragmentos (FP-1 ou FP-2), sensibilizamos placas de ELISA com 2 µg/mL de cada uma das proteínas em estudo e utilizamos como anticorpo primário soros de camundongos imunizados com a proteína FP-3 na presença de ACF/AIF (Figura 12). Ao final do ensaio podemos observar que anticorpos anti-MSP-3β (FP-3) reconhecem preferencialmente o fragmento FP-1, além da própria proteína homóloga. Entretanto, quando realizamos o ensaio com anticorpo contra a cauda de histidina, observamos que esse fragmento liga menos na placa do que as outras duas proteínas (FP-2 e FP-3), o que provavelmente explica esse menor reconhecimento de FP-2.

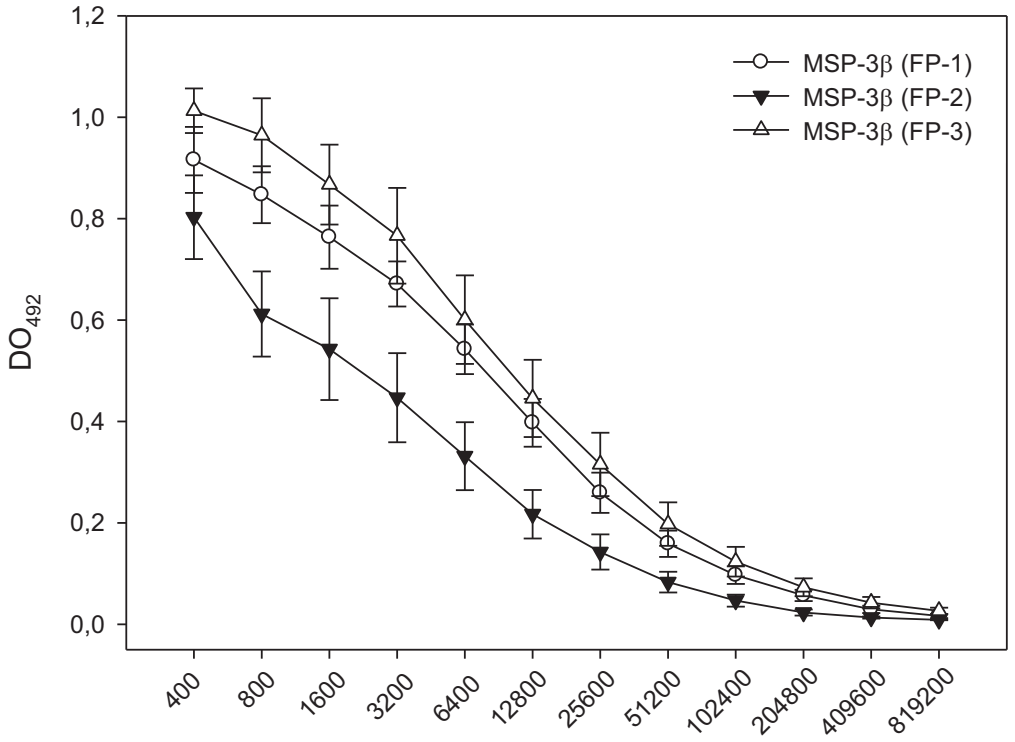

Figura 12. Análise comparativa do reconhecimento dos fragmentos da MSP-3β (FP-1 e FP-2) por soros policlonais contra a proteína inteira (FP-3). Placas de ELISA foram sensibilizadas com 2 µg/mL de cada um dos fragmentos recombinantes da MSP-3β (FP-1 ou FP-2). Os soros policlonais anti-MSP-3β (FP-3) foram testados em diferentes diluições a partir de 1:400. Os resultados estão expressos em DO_{492} +/- SEM.

6. Análise da reatividade cruzada entre as proteínas MSP-3α e MSP-3β

Para investigar a existência de reatividade cruzada entre as proteínas MSP-3α e MSP-3β, placas de ELISA foram sensibilizadas com cada uma das proteínas selecionadas (MSP-3α FP-1 ou MSP-3β FP-3), as quais representam a maior parte de cada umas das proteínas. Utilizamos como anticorpo primário soros policlonais de camundongo imunizados com a proteína MSP-3α (FP-1) ou MSP-3β (FP-3), conforme representado na figura 13. Ao final do ensaio podemos observar que, aparentemente, não há reatividade cruzada entre as proteínas MSP-3α e MSP-3β ou essa reatividade cruzada é muito baixa, pois soros policlonais anti-MSP-3β foram

capazes de reconhecer fracamente a proteína MSP-3α na placa, Por outro lado, soros policlonais anti-MSP-3α não foram capazes de reconhecer a proteína MSP-3β na placa.

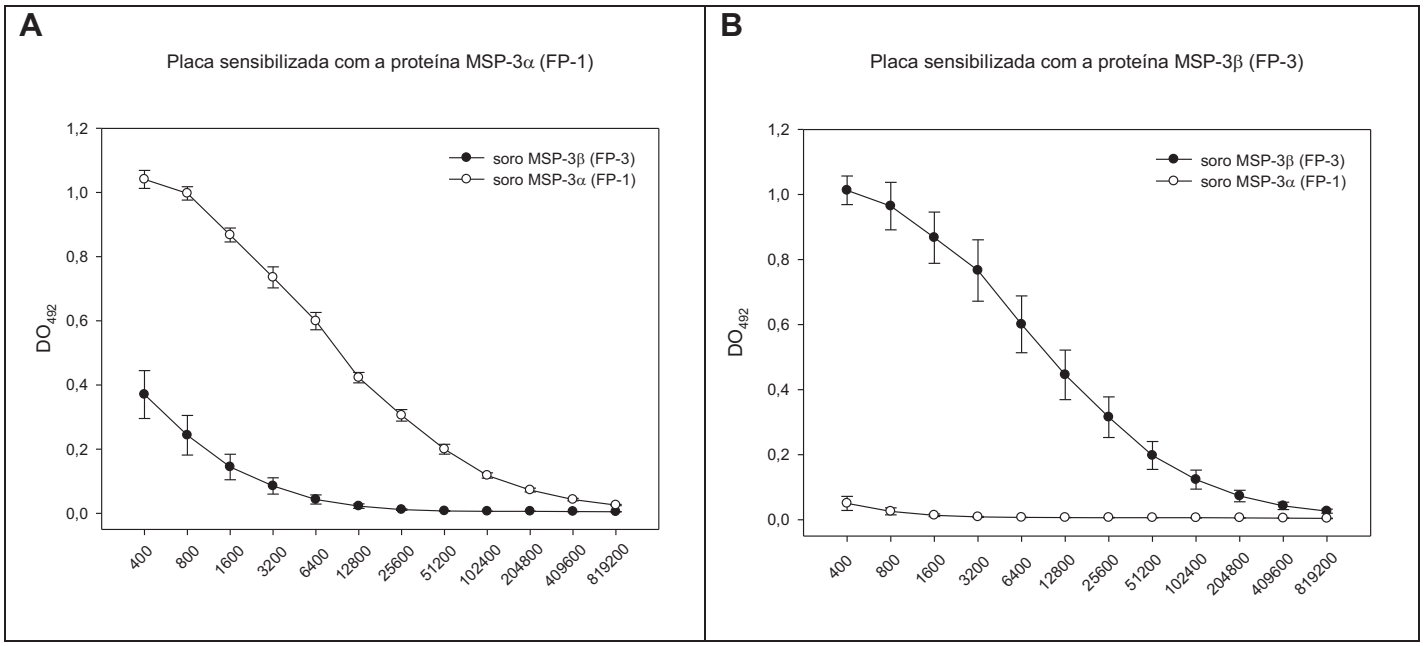

Figura 13. Análise da reatividade cruzada entre as proteínas MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-3). Placas de ELISA foram sensibilizadas com 2 µg/mL da proteína homóloga ou heteróloga. Os soros policlonais foram testados em diferentes diluições a partir de 1:400. **A**: Placa sensibilizada com a proteína MSP-3α (FP-1); **B**: Placa sensibilizada com a proteína MSP-3β (FP-3). Os resultados estão expressos em DO_{492} +/- SEM.

7. Reconhecimento da proteína nativa expressa em merozoítos de *P. vivax* por anticorpos anti-MSP-3

Em experimentos de imunofluorescência indireta em lâminas contendo esquizontes de *P. vivax* fixados, observamos, que os anticorpos policlonais anti-MSP-3 foram capazes de reconhecer a proteína nativa. Desta forma, podemos observar na figura 14 que os soros dos camundongos imunizados com as proteínas MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-3) na presença de ACF/AIF, foram capazes de reconhecer o parasito. De forma semelhante, soros de camundongos imunizados com as proteínas MSP-3β (FP-1 e FP-2) também foram capazes de reconhecer a

proteína nativa, porém em menor intensidade (dados não mostrados). Assim, não só os epítopos são preservados na proteína recombinante, como eles são capazes de gerar anticorpos em camundongos que reconhecem os mesmos epítopos presentes no parasito. Devido a limitação de lâminas contendo parasitos, não foi possível realizar o ensaio com os soros policlonais de camundongos anti-MSP-3α e MSP-3β gerados na presença dos demais adjuvantes testados.

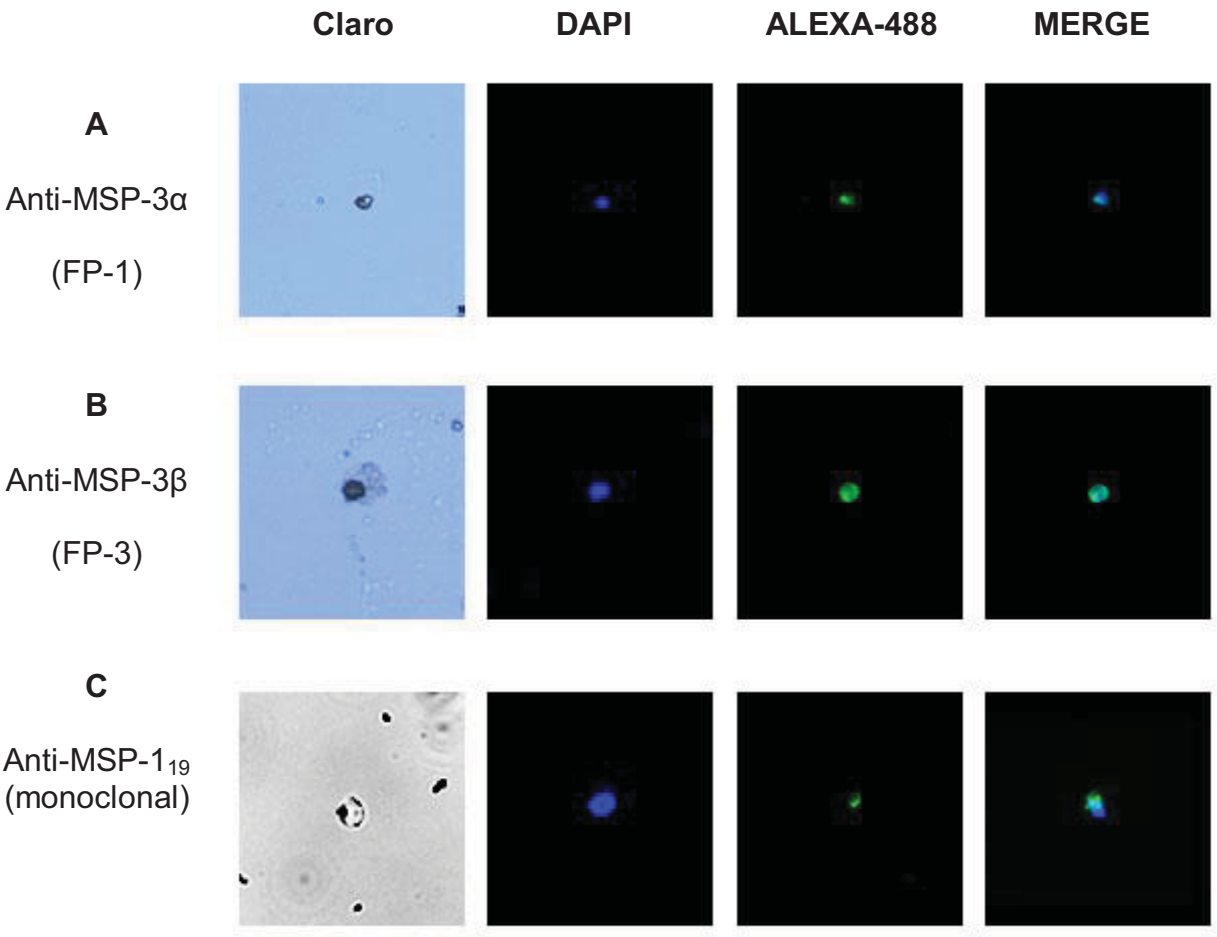

Figura 14. Ensaio de imunofluorescência indireta com soros de camundongos BALB/c após imunizações com cada uma das proteínas baseadas na MSP-3 na presença de ACF/AIF. Esquizontes foram incubados com "pool" de soros de camundongos imunizados (1:50) e adicionados a lâminas de IFA. Em seguida a incubação, os anticorpos IgG que se ligaram aos parasitos foram marcados por anticorpos de cabra anti-IgG de camundongo conjugados a FITC e o núcleo dos parasitos foram marcados com DAPI. **A**: soro policlonal anti-MSP-3α (FP-1); **B**: soro policlonal anti-MSP-3β (FP-3); **C**: controle positivo (anticorpo monoclonal anti-MSP-1$_{19}$). O controle negativo do ensaio foi soro de camundongos imunizados somente com adjuvante (ACF/AIF), o qual não apresentou fluorescência (dados não mostrados).

V. DISCUSSÃO

A malária continua a ser uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade no mundo. As atuais medidas de controle são apenas parcialmente eficazes e, portanto, o desenvolvimento de uma vacina que possa proporcionar um elevado grau de proteção é de alta prioridade. Nos últimos anos produzimos diversas proteínas recombinantes baseadas na MSP-1 e AMA-1 de *P. vivax* a partir de diferentes sistemas de expressão, as quais foram utilizadas para a imunização de camundongos e macacos na presença de diferentes formulações de adjuvantes além do próprio ACF/AIF (CUNHA, 2001; SOARES; RODRIGUES, 2002; ROSA et al., 2004, 2006, 2007; MUFALO et al., 2008; BARGIERI et al., 2007, 2008; GENTIL et al., 2010). Com base nos resultados destes estudos, foi proposto nesse projeto dar continuidade às imunizações pré-clínicas em camundongos utilizando as proteínas recombinantes MSP-3α e MSP-3β de *P. vivax* produzidas, a partir do sistema bacteriano de expressão. O nosso objetivo foi avaliar a imunogenicidade da *Pv*MSP-3α e da *Pv*MSP-3β em camundongos na presença de diferentes formulações de adjuvantes, a fim de selecionar algumas combinações antígeno-adjuvante para serem utilizadas em futuras imunizações de primatas não humanos.

Inicialmente, avaliamos a imunogenicidade das proteínas recombinantes MSP-3α (FP-1), MSP-3β (FP-1, FP-2 e FP-3) em camundongos na presença dos adjuvantes ACF/AIF. Nosso objetivo foi verificar se a imunização com essas proteínas recombinantes seriam capazes de induzir títulos altos de anticorpos. Esta determinação foi feita por ELISA utilizando placas sensibilizadas com cada uma das proteínas recombinantes MSP-3α (FP-1), MSP-3β (FP-1, FP-2 e FP-3). Após o término do esquema de imunizações (3 doses), concluímos que a imunização com as proteínas recombinantes MSP-3α (FP-1), MSP-3β (FP-1, FP-2 e FP-3) na presença de ACF/AIF foi eficiente, não havendo diferença estatisticamente

significativa entre elas (Figura 7). Vale a pena salientar que o ACF/AIF foi utilizado nesse experimento por ser um adjuvante forte, mas que ele não poderá ser utilizado em pesquisas com primatas.

Como as proteínas foram geradas em *E. coli*, uma possibilidade é que a presença de contaminantes bacterianos (LPS) pudesse estar mascarando os resultados obtidos. A fim de esclarecer essa questão, realizamos a imunização de camundongos C57BL/6 TLR4 *KO* e *Wild Type* com cada uma das proteínas, na ausência de adjuvantes. Após o término do esquema de imunizações (3 doses), concluímos que o LPS não têm interferência no nosso sistema, uma vez que não observamos diferenças significativas nos níveis de anticorpos obtidos quando comparamos os dois grupos de animais testados. A única exceção foi com relação a proteína MSP-3β (FP-2) que, após a terceira dose, induziu níveis de anticorpos mais elevados nos animais *Wild Type*, quando comparado aos animais TLR4 *KO* (Figura 8). De fato, recentemente, a presença de LPS nas proteínas em estudo foi investigada e foi confirmado que um certo grau de contaminação existe (dados não mostrados), mas podemos afirmar pelos resultados apresentados na Figura 8, que os níveis detectados não interferem nas nossas conclusões.

Um outro dado interessante obtido com esse experimento foi que a proteína MSP-3β (FP-3), aparentemente, tem uma propriedade adjuvante intrínseca que é independente do TLR4 (Figura 8). Com base nessas informações, é nosso intuito, futuramente, investigar com mais profundidade esse aspecto estudando o efeito da interação dessa proteína com células dendríticas. É importante ressaltar que a ausência de componentes do parasito com propriedades adjuvantes (ativadores de TLR) é uma das barreiras que dificulta o desenvolvimento de vacinas contra doenças parasitárias de um modo geral, ao contrário de vírus e bactérias que

apresentam diversos componentes ativadores de TLR (revisto por KAWAI; AKIRA, 2011).

No que se refere aos estudos com a proteína ortóloga de *P. falciparum* (*Pf*MSP-3), várias imunizações experimentais têm sido realizadas em camundongos (BADELL et al., 2000; DRUILHE et al., 2005; POLLEY et al., 2007) e macacos (HISAEDA et al., 2002; CARVALHO et al., 2005; PERLAZA et al., 2008; TSAI et al., 2009) com a proteína gerada a partir de diferentes sistemas de expressão, entre eles, levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) (HISAEDA et al., 2002; DRUILHE et al., 2005; PERLAZA et al., 2008) e bactérias *Lactococcus lactis* (CARVALHO et al., 2005) ou *Escherichia coli* (POLLEY et al., 2007; TSAI et al., 2009). Foi demonstrado que anticorpos anti-*Pf*MSP-3 induzidos pela imunização na presença de Alum foram capazes de inibir a invasão de eritrócitos (DRUILHE et al., 2005). Além disso, foi observado, na maioria dos casos, proteção contra a infecção em camundongos e macacos imunizados com a proteína *Pf*MSP-3 na presença dos adjuvantes Montanide ISA 720, ACF/ AIF e ASO2 (QS-21 + MPL) os quais estão representados na tabela 3 da introdução (BADELL et al., 2000; HISAEDA et al., 2002; CARVALHO et al., 2005; PERLAZA et al., 2008; TSAI et al., 2009).

Com base nas informações acima, decidimos dar continuidade as imunizações pré-clínicas em camundongos utilizando as proteínas recombinantes MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-3) formuladas na presença de diferentes adjuvantes, incluindo agonistas de TLR, uma vez que o ACF não é permitido para uso em imunizações de primatas. Apesar dessa restrição, o ACF é amplamente utilizado para estudos que avaliam a imunogenicidade de antígenos no modelo murino, e promove altos títulos de anticorpos IgG. A imunogenicidade destas proteínas recombinantes foi avaliada em camundongos BALB/c, utilizando como adjuvantes agonistas de TLR [flagelina

FliC de *Salmonella Typhimurium* (TLR5), o qual vem sendo utilizado em testes experimentais de vacina contra a malária com bons resultados. Camundongos imunizados por via parenteral com *Pv*MSP1$_{19}$ na presença de FliC, quer misturados ou ligados geneticamente, apresentaram forte e duradoura respostas de anticorpos específicos com uma resposta de subclasse IgG1 vigente. A FliC contém propriedades adjuvantes e capacidade de induzir resposta humoral e celular, quando administrada isoladamente, ou em combinação com outros adjuvantes (BARGIERI et al., 2008). Camundongos imunizados por via subcutânea, com FliC-MSP1$_{19}$ de *P. falciparum* desenvolveram fortes respostas de anticorpos específicos, com a predominância da subclasse IgG1. Estes resultados demonstram que a fusão da FliC aos antígenos de *Plasmodium* é uma alternativa promissora para melhorar a sua imunogenicidade (BARGIERI et al., 2010) e CpG ODN 1826 (TLR9)] ou com adjuvantes convencionais, tais como hidróxido de alumínio, saponinas, TiterMax e AIF. Apesar da restrição ao Adjuvante de Freund, o mesmo foi incluído em nosso estudo para efeito comparativo, por ser capaz de induzir altos títulos de anticorpos. Pode-se observar que após a terceira dose os animais imunizados com a proteína recombinante MSP-3α (FP-1) na presença de diferentes adjuvantes geraram altos títulos de IgG total. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos imunizados na presença dos adjuvantes AIF, TiterMax e Quil A. Por outro lado, os títulos de IgG dos grupos imunizados na presença dos adjuvantes Alum, FliC e CpG ODN 1826 foram significativamente mais baixos quando comparados ao grupo do adjuvante AIF (Figura 9).

Observamos que a resposta de anticorpos IgG induzida em camundongos com a proteína MSP-3β (FP-3) na presença de diferentes adjuvantes geraram altos títulos de IgG total. Não houve diferença estatísticamente significativa entre os

grupos imunizados na presença dos adjuvantes AIF, TiterMax e Quil A. Por outro lado, os títulos de IgG dos grupos imunizados na presença dos adjuvantes Alum, FliC e CpG ODN 1826 foram significativamente mais baixos quando comparado ao grupo do adjuvante AIF (Figura 10). Consideramos essa informação importante, pois o Alum é um dos poucos adjuvantes licenciados para uso no homem, além de ser utilizado em outras formulações vacinais disponíveis comercialmente, as quais são baseadas em proteínas recombinantes, como a vacina contra a hepatite B (vários fabricantes) e HPV (Gardasil®, Merck) (STOUTE et al., 1997).

Com a proteína ortóloga de *P. falciparum* o Alum foi o adjuvante mais utilizado em estudos clínicos preliminares. A formulação *Pf*MSP-3 na presença do adjuvante Alum foi segura e imunogênica em todos os casos demonstrados na tabela 4 da introdução (AUDRAN et al., 2005; DRUILHE et al., 2005; ELSEN et al., 2009; NEBIE et al., 2009; LUSINGU et al., 2009). Além disso, a vacina recombinante RTS,S contra a malária *falciparum* foi formulada em Alum + MPL (SBAS4), a qual foi muito menos potente do que a emulsão atualmente utilizada em testes clínicos de fase 2, que consiste em MPL + QS-21, em água em óleo (SBAS2). Esse fato reforça a importância de se buscar adjuvantes alternativos para uso com proteínas recombinantes de malária.

Após demonstrarmos que a proteína recombinante MSP-3β (FP-3) foi imunogênica em camundongos na presença dos diferentes adjuvantes testados, selecionamos essa proteína para ser testada de forma combinada com os adjuvantes CpG ODN 1826 + FliC e CpG ODN 1826 + Alum, com o objetivo de avaliar se o CPG-ODN 1826 poderia melhorar a eficiência de Alum ou FliC. A combinação de CPG-ODN 1826 com outros adjuvantes já vem sendo explorada em outros trabalhos. Em 2008, BARGIERI e colaboradores utilizaram a combinação de

CPG-ODN 1826 com FliC em testes experimentais de vacina contra a malária *vivax* que resultou em uma resposta mais equilibrada, avaliada pela razão IgG1/IgG2. Neste experimento (Figura 11), observamos que as formulações combinadas foram capazes de induzir títulos de anticorpos IgG estatisticamente mais altos (nos dois casos) do que os grupos que receberam apenas a proteína emulsificada em um único adjuvante (Alum ou FliC).

Os isotipos de IgG predominantes na resposta induzida com as proteínas MSP-3α (FP-1), MSP-3β (FP-1, FP-2 e FP-3) na presença dos adjuvantes ACF/AIF, foram IgG1, IgG2a e IgG2b, caracterizando uma resposta mista Th1/Th2 (Tabela 7). Por outro lado, para os domínios selecionados da MSP-3 [MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-3)] a análise dos isotipos de IgG demonstrou um predomínio de IgG1, IgG2a e IgG2b caracterizando um padrão de resposta mista Th1/Th2 para a maioria dos grupos testados, exceto para a proteína MSP-3α (FP-1) na presença dos adjuvantes Alum, FliC e Quil A e para proteína MSP-3β (FP-3) na presença do adjuvante Alum que demonstrou um predomínio de IgG1 caracterizando um padrão de resposta Th2. Os adjuvantes Alum e FliC são indutores de resposta do tipo Th2, o que pode ser comprovado pelos altos títulos de IgG1 detectados (Tabelas 8 e 9). Entretanto, utilizando a proteína MSP-3β (FP-3) na presença dos adjuvantes CpG-ODN 1826 + Alum e CpG ODN 1826 + FliC, a adição do CpG ODN 1826, potente indutor de resposta Th1, utilizado de forma combinada com os adjuvantes FliC e Alum foi capaz de mudar a resposta imune para um padrão de resposta Th1, pois ocorreu um aumento do isotipo IgG2a (Tabela 10).

Diversos estudos de resposta celular mostraram que o Alum pode estimular uma resposta do tipo Th2, isso implica em um grande problema para o desenvolvimento de vacinas contra doenças que são inteira ou parcialmente

dependentes de resposta do tipo Th1, como por exemplo o HIV, a tuberculose e a malária (revisto por BREWER, 2006). Em situações experimentais este problema pode ser resolvido com a utilização de diferentes adjuvantes experimentais, como o adjuvante ACF/AIF, capaz de induzir resposta do tipo Th1. Entretanto a utilizaçao deste adjuvante pode promover inflamação, endurecimento e até necrose no local da aplicação. Claramente, a falta de um adjuvante clinicamente aplicável, capaz de induzir uma resposta do tipo Th1, representa um obstáculo significativo a aplicação efetiva de vacinas contra essas doenças (revisto por BREWER, 2006). Uma possível solução é a constituição de sistemas de adjuvantes capazes de promover o balanceamento de uma resposta conforme desejado, como por exemplo os sistemas utilizados no presente estudo, CpG ODN 1826 + Alum ou CpG ODN 1826 + FliC.

As proteínas em estudo são boas candidatas a testes a vacina contra a malária por todas as caracteristicas já descritas acima, assim como foi possível observar que anticorpos policlonais anti-MSP-3 foram capazes de reconhecer a proteína nativa, não só os epítopos são preservados na proteína recombinante, como eles são capazes de gerar anticorpos em camundongos que reconhecem os mesmos epítopos presentes no parasito. Não há reatividade cruzada entre as proteínas MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-3), pois não houve reconhecimento do anticorpo por nenhum dos antígenos. Anticorpos anti-MSP-3β (FP-3) reconhecem os dois fragmentos da proteína (FP-1 e FP-2). Sendo assim, as proteínas presentes nesse estudo, são ótimas candidatas a testes pré-clínicos em primatas não humanos.

VI. CONCLUSÕES

1. Nossos resultados demonstram que as proteínas recombinantes: *Pv*MSP-3 α (FP-1), *Pv*MSP-3β (FP-1, FP-2 e FP-3) foram altamente imunogênicas em camundongos BALB/c quando administradas na presença de ACF/AIF.

2. A proteína MSP-3β (FP-3) tem uma propriedade intrínseca adjuvante que é independente do TLR4 e o LPS não têm interferência no nosso sistema.

3. As proteínas recombinantes *Pv*MSP-3α (FP-1) e *Pv*MSP-3β (FP-3) foram altamente imunogênicas em camundongos BALB/c quando administradas na presença dos diferentes adjuvantes testados. Dentre as formulações testadas, aquelas contendo os adjuvantes CPG ODN 1826, Quil A, TiterMax e adjuvante incompleto de Freund foram mais imunogênicas.

4. Anticorpos induzidos em camundongos pela imunização com as proteínas MSP-3α (FP-1) e MSP-3β (FP-1, FP-2 e FP-3) na presença do adjuvante ACF/AIF (policlonais) foram capazes de reconhecer a proteína exposta em isolados naturais de *P.vivax*, sugerindo que estes mesmos epítopos estão preservados na proteína recombinante.

5. Em conjunto, nossos resultados sugerem que algumas combinações antígeno-adjuvante testadas aqui são consideradas promissoras para futuros testes pré-clínicos em primatas não humanos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, S.; AGRAWAL, A.; DOUGHTY, B.; GERWITZ, A.; BLENIS, J.; VAN DYKE, T.; PULENDRAN, B. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. **J Immunol.** 171(10):4984-9, 2003.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MENARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nat Med.** 12(2):220-4, 2006.

ANGEL, J. B.; COOPER, C. L.; CLINCH, J.; YOUNG, C. D.; CHENIER, A.; PARATO, K. G.; LAUTRU, M.; DAVIS, H.; CAMERON, D. W. CpG increases vaccine antigen-specific cell-mediated immunity when administered with hepatitis B vaccine in HIV infection. **J Immune Based Ther Vaccines.** 12(6):4, 2008.

APPLEQUIST, S. E.; ROLLMAN, E.; WAREING, M. D.; LIDÉN, M.; ROZELL, B.; HINKULA, J.; LJUNGGREN, H. G. Activation of innate immunity, inflammation, and potentiation of DNA vaccination through mammalian expression of the TLR5 agoinst flagellin. **J Immunol.** 175(6):3882-91, 2005.

ARESHA, M.; SANATH, M.; DEEPIKA, F.; RENU, W.; ANURA, B.; CHANDITHA, H.; WIMALADHARMA, A.; RAJITHA, W. Genotyping of *Plasmodium vivax* infections in Sri Lanka using Pvmsp-3alpha and Pvcs genes as markers: a preliminary report. **Trop Biomed.** 25(2):100-6, 2008.

ARÉVALO-HERRERA, M.; HERRERA, S. *Plasmodium vivax* malaria vaccine development. **Mol Immunol.** 38(6):443-55, 2001.

ARÉVALO-HERRERA, M.; CHITNIS, C.; HERRERA, S. Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. **Hum. Vaccin.** 6(1):124-32, 2010.

AUDRAN, R.; CACHAT, M.; LURATI, F.; SOE, S.; LEROY, O.; CORRADIN, G.; DRUILHE, P.; SPERTINI, F. Phase I malaria vaccine trial with a long synthetic peptide derived from the merozoite surface protein 3 antigen. **Infec Immun.** 73(12):8017-26, 2005.

BADELL, E.; OEUVRAY, C.; MORENO, A.; SOE, S.; VAN ROOIJEN, N.; DRUILHE, P. Human malaria in immunocompromised mice: an in vivo model to study defense mechanisms against *Plasmodium falciparum*. **J Exp Med**. 192(11):1653-60, 2000.

BARGIERI, D. Y.; ROSA, D. S.; LASARO, M. A.; FERREIRA, L. C.; SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Adjuvant requirement for successful immunization with recombinant derivatives of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 delivered via the intranasal route. **Mem Inst Oswaldo Cruz**.102(3):313-7, 2007.

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**. 26(48):6132-42, 2008.

BARGIERI, D. Y.; LEITE, J. A.; LOPES, S. C.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; BRAGA, C. J.; FERREIRA, L. C.; SOARES, I. S.; COSTA, F. T.; RODRIGUES, M. M. Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of *Plasmodium falciparum* merozoite surfece protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of *Salmonella typhimurium*. **Vaccine.** 28(16):2818-26, 2010.

BARGIERI, D.; SOARES, I. S.; COSTA, F.; BRAGA, C.; FERREIRA, L.; RODRIGUES, M. M. Malaria vaccine development: are bacterial flagellin fusion proteins the bridge between mouse humans? **J Parasitol Research.** [Epub ahead of print], 2011.

BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R. *Plasmodium vivax*: a glimpse into the unique and shared biology of merozoite. **Ann Trop Med Parasitol.** 89(2):113-20, 1995.

BARNWELL, J. W.; GALINSKI, M. R.; DESIMONE, S. G.; PERLER, F.; INGRAVALLO, P. *Plasmodium vivax*, *P. cynomolgi*, and *P. knowlesi*: identification homologue proteins associated with the surface of merozoites. **Exp Parasitol.** 91(3):238-49, 1999.

BASSAT, Q.; ALONSO, P. L. Defying malaria: Fathoming severe *Plasmodium vivax* disease. **Nat Med.** 17(1):48-9, 2011.

BELL, B. A.; WOOD, J. F.; BANSAL, R.; RAGAB, H.; CARGO, J.; WASHINGTON, M. A.; WOOD, C. I.; WARE, L. A.; OCKENHOUSE, C. F.; YADAVA, A. Process development for the production of an *E. coli* produced clinical grade recombinant malaria vaccine for *Plasmodium vivax.* **Vaccine**. 27(9):1448-53, 2009.

BENNETT, B.; CHECK, I. J.; OLSEN, M. R.; HUNTER, R. L. A comparison of commercially available adjuvants for use in research. **J Immunol Methods.** 153(1-2):31-40, 1992.

BILLIAU, A.; MATHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **J Leukoc Biol.** 70(6):849-60, 2001.

BLACK, C. G.; BARNWELL, J. W.; HUBER, C. S.; GALINSKI, M. R.; COPPEL, R. L. The Plasmodium vivax homologues of merozoite surface proteins 4 and 5 from Plasmodium falciparum are expressed at different locations in the merozoite. **Mol Biochem Parasitol.** 120(2):215-24, 2002.

BREWER, J. M. (How) do aluminium adjuvants work? **Immunol. Lett.** 102(1):10-5, 2006.

BOWMAN, S.; LAWSON, D.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINWORTH, T.; CHURCHER, C. M.; CRAIG, A.; DAVIES, R. M.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; GWILLIAM, R.; HAMLIN, N.; HARRIS, D.; HORNSBY, T.; HORROCKS, P.; JAGELS, K.; JASSAL, B.; KYES, S.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MUNGALL, K.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; RUTTER, S.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J. R.; NEWBOLD, C.; BARREL, B. G. The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*. **Nature**. 400(6744):532-8, 1999.

BROWN, G. V.; MOORTHY, V. S.; REED, Z.; MENDIS, K.; HERRERA, M. A.; ALONSO, P. Priorities in research and development of vaccines against *Plasmodium vivax* malaria. **Vaccine.** 27(52):7228-7235, 2009.

BRUCE, M. C.; GALINSKI, M . R.; BARNWELL, J. W.; SNOUNOU, G.; DAY, K. P. Polymorphism at the merozoite surface protein-3alpha locus of *Plasmodium vivax*: global and local diversity. **Am J Trop Med Hyg.** 61(4):518-25, 1999.

BURGESS, M. A.; MCINTYRE, P. B. Vaccines and the cold chain: is it too hot… or too cold? **Med J Aust.** 171(2):82, 1999.

BURGESS, B. R.; SCHUCK, P.; GARBOCZI, D. N. Dissection of merozoite surface protein 3, a representative of family of *Plasmodium falciparum* surface proteins, reveals an oligomeric and highly elongated molecule. **J Biol Chem.** 208 (44):37236-37245, 2005.

CARLTON, J. M.; ADAMS, J. H.; SILVA, J. C.; BIDWELL, S. L.; LORENZI, H.; CALER, E.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S. V.; MERINO, E. F.; AMEDEO, P.; CHENG, Q.; COULSON, R. M.; CRABB, B. S.; DEL PORTILLO, H. A.; ESSIEN, K.; FELDBLYUM, T. V.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; GILSON, P. R.; GUEYE, A. H.; GUO, X.; KANG'A, S.; KOOIJ, T. W.; KORSINCZKY, M.; MEYER, E. V.; NENE, V.; PAULSEN, I.; WHITE, O.; RALPH, S. A.; REN, Q.; SARGEANT, T. J.; SALZBERG, S. L.; STOECKERT, C. J.; SULLIVAN, S. A.; YAMAMOTO, M. M.; HOFFMAN, S. L.; WORTMAN, J. R.; GARDNER, M. J.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; FRASER-LIGGET, C. M. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nature.** 455(7214):757-63, 2008.

CARVALHO, L. J.; ALVES, F. A.; BIANCO, C. Jr.; OLIVEIRA, S. G.; ZANINI, G. M.; SOE, S.; DRUILHE, P.; THEISEN, M.; MUNIZ, J. A.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Immunization of Saimiri sciureus monkeys with a recombinant hybrid protein derived from the *Plasmodium falciparum* antigen glutamate-rich protein and merozoite surface protein 3 can induce partial protection with Freund and Montanide ISA720 adjuvants. **Clin Diagn Lab Immunol.** 12(2):242-8, 2005.

CARVALHO, B. O.; LOPES, S. C.; NOGUEIRA, P. A.; ORLANDI, P. P.; BARGIERI, D. Y.; BLANCO, Y. C.; MAMORI, R.; LEITE, J. A.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S.; OLIVEIRA, T. R.; WUNDERLICH, G.; LACERDA, M. V.; DEL PORTILHO, H. A.; ARAÚJO, M. O.; RUSSELL, B.; SUWANARUSK, R.; SNOUNOU, G.; RÉNIA, L.; COSTA, F. T. On the cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-infected erytocytes. **J Infect Dis.** 202(4):638-47, 2010.

CAVASINI, C. E.; MATTOS, L. C.; COUTO, A. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; VALENCIA, S. H.; NEIRAS, W. C.; ALVES, R. T.; ROSSIT, A. R.; CASTILHO, L.; MACHADO, R. L. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amozon region: na exception? **Trans R SOC Trop Med Hyg.** 101(10):1042-4, 2007a.

CAVASINI, C. E.; MATTOS, L. C.; COUTO, A. A.; COUTO, V.S.; GOLLINO, Y.; MORETTI, L. J.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; ROSSIT, A. R.; CASTILHO, L.; MACHADO, R. L. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria *vivax* patients in four áreas of Brazilian Amazon region. **Malar J.** 19(6):167, 2007b.

CLEMENTS, C. J.; GRIFFITHS, E. The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. **Vaccine.** 20(Suppl 3):S24-33, 2002.

CLYDE, D. F. Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, 1971-75. **Bull World Health Organ**. 68(Suppl):9-12, 1990.

COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. **Immunity.** 33(4):492-503, 2010.

COX, J. C.; COULTER, A. R. Adjuvants—a classification and review of their modes of action. **Vaccine.** 15(3):248-56, 1997.

COX-SINGH, J.; DAVIS, T. M.; LEE, K. S.; SHAMSUL, S. S.; MATUSOP, A.; RATNAM, S.; RAHMAN, H. A.; CONWAY, D. J.; SINGH, B. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. **Clin Infect Dis.** 46(2):165-71, 2008.

CRISTIANO, F. A.; PÉREZ, M. A.; NICHOLLS, R. S.; GUERRA, A. P. Polymorphism in the *Plasmodium vivax* msp 3: gene in Field samples from Tierralta, Colombia. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 103(5):493-6, 2008.

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.

CUNNINGHAM, A. F.; KHAN, M.; BALL, J.; TOELLNER, K. M.; SERRE, K.; MOHR, E.; MACLENNAN, I. C. Responses to the soluble flagelar protein FliC are Th2, while those to FliC on Salmonella are Th1. **Eur J Immunol.** 34(11):2986-95, 2004.

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 U S A.** 88(9):4030-4, 1991.

DE VRIES, I. J.; TEL, J.; BENITEZ-RIBAS, D.; TORENSMA, R.; FIGDOR, C. G. Prophylactic vaccines mimic synthetic CpG oligonucleotides in their ability to modulate immune responses. **Mol Immunol.** 48(6-7):810-7, 2011.

DIDIERLAURENT, A.; FERRERO, I.; OTTEN, L. A.; DUBOIS, B.; REINHARDT, M.; CARLSEN, H.; BLOMHOFF, R.; AKIRA, S.; KRAEHENBUHL, J. P.; SIRARD, J. C. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. **J Immunol.** 172(11):6922-30, 2004.

DIDIERLAURENT, A. M.; MOREL, S.; LOCKMAN, L.; GIANNINI, S. L.; BISTEAU, M.; CARLSEN, H.; KILLAND, A.; VOSTERS, O.; VANDERHEYDE, N.; SCHIAVETTI, F.; LAROCQUE, D.; VAN MECHELEN, M.; GARÇON, N. AS04, an aluminum salt-and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. **J Immunol.** 183(10):6186-97, 2009.

DITTIMER, U.; OLBRICH, A. R. Treatment of infectious diseases with immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. **Curr Opin Microbiol.** 6(5):472-7, 2003.

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.** 2(11):344, 2005.

ESEN, M.; KREMSNER, P. G.; SCHLEUCHER, R.; GASSLER, M.; IMOUKHUEDE, E. B.; IMBAULT, N.; LEROY, O.; JEPSEN, S.; KNUDSEN, B. W.; SCHUMM, M.; KNOBLOCH, J.; THEISEN, M.; MORDMULLER, B. Safety and immunogenicity of GMZ2 – a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. **Vaccine.** 27(49):6862-8, 2009.

FANG, X. D.; KASLOW, D. C.; ADAMS, J. H.; MILLER, L. H. Cloning of the Plasmodium vivax Duffy receptor. **Mol Biochem Parasitol.** 44(1):125-32, 1991.

FREEMAN, R. R.; HOLDER, A. A. Surface antigens of malaria merozoites. A high molecular weight precursor is processed to an 83,000 mol wt form expressed on the surface of Plasmodium falciparum merozoites. **J Exp Med.** 158(5):1647-53, 1983.

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.** 101(1-2):131-47, 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 similarites with *P. Vivax* merozoite surface protein-3alpha and define a new gene family. **Mol Biochem Parasitol.** 115(1):41-53, 2001.

GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax*: Who cares? **Malar J**. 7(Suppl I):S9, 2008.

GARDNER, M. J.; HALL, N.; FUNG, E.; WHITE, O.; BERRIMAN, M.; HYMAN, R. W.; CARLTON, J. M.; PAIN, A.; NELSON, K. E.; BOWMAN, S.; PAULSEN, I. T.; JAMES, K.; EISEN, J. A.; RUTHERFORD, K.; SALZBERG, S. L.; CRAIG, A.; KYES, S.; CHAN, M. S.; NENA, V.; SHALLOM, S.J.; SUH, B.; PETERSON, J.; ANGIUOLI, S.; PERTEA, M.; ALLEN, J.; SELENGUT, J.; HAFT, D.; MATHER, M. W.; VAIDYA, A. B.; MARTIN, D. M.; FAIRLAMB, A. H.; FRAUNHOLZ, M. J.; ROSS, D. S.; RALPH, S. A.; MCFADDEN, G. I.; CUMMINGS, L. M.; SUBRAMANIAN, G. M.; MUNGALL, C.; VENTER, J. C.; CARUCCI, D. J.; HOFFMAN, S. L.; NEWBOLD, C.; DAVIS, R. W.; FRASER, C. M.; BARRELL, B. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. **Nature.** 419(6906):498-511, 2002.

GAVIN, A. L.; HOEBE, K.; DUONG, B.; OTA, T.; MARTIN, C.; BEUTLER, B.; NEMAZEE, D. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. **Science.** 314(5807):1936-8, 2006.

GENTIL, F.; BARGIERI, D. Y.; LEITE, J. A.; FRANÇOSO, K. S.; PATRICIO, M. B.; ESPÍNDOLA, 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 titers in mice. **Vaccine.** 28 (38):6183-90, 2010.

GUERRA, C. A.; SNOW, R. W.; HAY, S. I. Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends Parasitol.** 22(8):353-8, 2006.

HAYASHI, F.; SMITH, K. D.; OZINSKY, A.; HAWN, T. R.; YI, E. C.; GOODLETT, D. R.; ENG, J. K.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D. M.; ADEREM, A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature.** 410(6832):1099-103, 2001.

HEMMI, H.; KAISHO, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. The roles of toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. **J Immunol.** 170(6):3059-64, 2003.

HERRERA, M. A.; ROSERO, F.; HERRERA, S.; CASPERS, P.; ROTMANN, D.; SINIGAGLIA, F.; CERTA, U. Protection against malaria in Aotus monkey immunized with a recombinant blood-stage antigen fused to a universal T-cell epitope: correlation of serum gamma interferon levels with protection. **Infect Immun.** 60(1):154-8, 1992.

HERRERA, S.; BONELO, A.; PERLAZA, B. L.; FERNÁNDEZ, O. L.; VICTORIA, L., LENIS, A. M.; SOTO, L.; HURTADO, H.; ACUÑA, L. M.; VÉLEZ, J. D.; PALACIOS, R.; CHENMOK, M.; CORRADIN, G.; ARÉVALO-HERRERA, M. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in colombian malaria-naive volunteers by a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. **Am J Trop Med Hyg.** 73(5Suppl):3-9, 2005.

HERRERA, S.; CORRADIN, G.; ARÉVALO-HERRERA, M. An update on the search for *Plasmodium vivax* vaccine. **Trends Parasitol.** 23(3):122-8, 2007.

HISAEDA, H.; SAUL, A.; REECE, J. J.; KENNEDY, M. C.; LONG, C. A.; MILLER, L. H.; STOWERS, A. W. Merozoite surface protein against malaria in Aotus nancymai monkeys. **J Infect Dis.** 185(5):657-64, 2002.

HODDER, A. N.; CREWTHER, P. E.; MATTKEW, M. L.; REID, G. E.; MORITZ, R. L.; SIMPSON, R. J.; ANDERS, R. F. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. **J Biol Chem.** 271(46):29446-52, 1996.

HONKO, A. N.; SRIRANGANATHAN, N.; LEES, C. J.; MIZEL, S. B. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis.* **Infect Immun.** 74(2):1113-20, 2006.

HULEATT, J. W.; JACOBS, A. R.; TANG, J.; DESAI, P.; KOPP, E. B.; HUANG, Y.; SONG, L.; NAKAAR, V.; POWELL, T. J. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor legands induces rapid cellular and humoral immunity. **Vaccine.** 25(4):763-75, 2007.

HULEATT, J. W.; NAKAAR, V.; DESAI, P.; HUANG, Y.; HEWITT, D.; JACOBS, A.; TANG, J.; MCDONALD, W.; SONG, L.; EVANS, R. K.; UMLAUF, S.; TUSSEY, L.; POWELL, T. J. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. **Vaccine.** 26(2):201-14, 2008.

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.** 1780(7-8):983-8, 2008.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptors and their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. **Immunity.** 34(5):637-50,2011.

KENNEY, R. T., EDELMAN, R. Survey of human-use adjuvants. **Expert Rev Vaccines.** 2(2):167-88, 2003.

KENSIL, C. R. Saponins as vaccine adjuvants. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.** 13(1-2):1-55, 1996.

KLINMAN, D. M. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immunoprotective agents. **Expert Opin Biol Ther.** 4(6):937-46, 2004.

KRIEG, A. M. CpG DNA: trigger of sepsis, mediator of protection, or both? **Scand J Infect Dis.** 35(9):653-9, 2003.

KRISTOFF, J. Malaria stage-specific vaccine candidates. **Curr. Pharm. Des.** 13(19):1989-99, 2007.

LIAUDET, L.; SZABÓ, C.; EVGENOV, O. V.; MURTHY, K. G.; PACHER, P.; VIRÁG, L.; MABLEY, J. G.; MARTON, A.; SORIANO, F. G.; KIROV, M. Y.; BJERTNAES, L. J.; SALZMAN, A. L. Flagellin from gram-negative bacteria is a potent mediator of acute pulmonary inflammation in sepsis. **Shock.** 19(2):131-7, 2003.

LJUNGSTRÖM, I.; PERLMANN, H.; SCHLICHTHERLE, M.; SCHERF, A.;WAHLGREN, M. Methods in malaria research. 4th ed. Manassas, Virginia, USA: MR4/ATCC, 2004.

LOMAR, A. V.; VIDAL, J. E.; LOMAR, F. P.; BARBAS, C. V.; DE MATOS, G. J.; BOULOS, M. Acute respiratory distress syndrome due to *vivax* malaria: case report and literature review. **Braz J Infect Dis.** 9(5):425-30, 2005.

LUSINGU, J. P.; GESASE, S.; MSHAM, S.; FRANCIS, F.; LEMNGE, M.; SETH, M.; SEMBUCHE, S.; RUTTA, A.; MINJA, D.; SEGEJA, M. D.; BOSOMPRAH, S.; COUSENS, S.; NOOR, R.; CHILENGI, R.; DRUILHE, P. Satisfactory safety and immunogenicity os MSP3 malaria vaccine candidate in Tanzanian children aged 12-24 months. **Malar J.** 17(8):163, 2009.

MAHANTY, S.; SAUL, A.; MILLER, L. H. Progress in the development of recombinant and synthetic blood-stage malaria vaccines. **J Exp Biol.** 206(Pt 21):3781-8, 2003.

MALKIN, E. M.; DURBIN, A. P.; DIEMERT, D. J.; SATTABONGKOT, J.; WU, Y.; MIURA, K.; LONG, C. A.; LAMBERT, L.; MILES, A. P.; WANG, J.; STOWERS, A.; MILLER, L. H.; SAUL, A. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking for *Plasmodium vivax* malaria. **Vaccine.** 23(24):3131-8, 2005.

MAZUMDAR, S.; MUKHERJEE, P.; YAZDANI, S. S.; JAIN, S. K.; MOHMMED, A.; CHAUHAN, V. S. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1) – MSP-3 chimeric protein: immunogenicity determined with human-compatible adjuvants and induction of protective immune response. **Infect Immun.** 78(2):872-83, 2010.

MCDERMOTT, P. F.; CIACCI-WOOLWINE, F.; SNIPES, J. A.; MIZEL, S. B. High-affinity interaction between gram-negative flagellin and cell surface polypeptide results in human monocyte activation. **Infect Immun.** 68(10):5525-9, 2000.

MEANS, T. K.; HAYASHI, F.; SMITH, K. D.; ADEREM, A.; LUSTER, A. D. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. **J Immunol.** 170(10):5165-75, 2003.

MILLER, L. H.; SAUL, A.; MAHANTY, S. Revisiting Freund's incomplete adjuvant for vaccines in the developing world. **Trends Parasitol.** 21(9):412-4, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Aspectos Epidemiológicos.** http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31086&janela=2 (Acessado em 26/ 04/ 2010).

MIZEL, S. B.; HONKO, A. N.; MOORS, M. A.; SMITH, P. S.; WEST, A. P. Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/ Toll-like receptor 4 complexes. **J Immunol.** 170(12):6217-23, 2003.

MIZEL, S. B.; GRAFF, A. H.; SRIRANGANATHAN, N.; ERVIN, S.; LEES, C. J.; LIVELY, M. O.; HANTGAN, R. R.; THOMAS, M. J.; WOOD, J.; BELL, B. Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates. **Clin Vaccine Immunol.** 16(1):21-8, 2009.

MOON, S. U.; KIM, H. H.; KIM T. S.; CHOI, K. M.; OH, C. M.; AHN, Y. J.; HWANG, S. K.; SOHN, Y.; SHIN, E. H.; KIM, H.; LEE, H. W. Blocking effect of a monoclonal antibody against recombinant Pvs25 on sporozoite development in Anopheles sinensis. **Clin Vaccine Immunol.** 17(8):1183-7, 2010.

MOURÃO, L. C.; MORAIS, C. G.; BUENO, L. L.; ALMEIDA, Z. B.; XAVIER, M.; SOARES, I. S.; FONTES, C. J.; BRAGA, E. M. Anticorpos IgG contra diferentes antígenos recombinantes de Merozoítos de *Plasmodium vivax* e sua associação à morbidade. **XII Reunião Nacional de Pesquisa em Malária.** Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, 2010.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; KOCHAR, D. K.; ALONSO, P. L.; DEL PORTILLO, H. A. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet Infect Dis.** 9(9):555-66, 2009.

MÚFALO, B. C.; GENTIL, F.; BARGIERI, D. Y.; COSTA, F. T.; 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.** 10(12-13):1266-73, 2008.

NARUM, D. L.; THOMAS, A. W. Differential localization of full-tength and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Mol Biochem Parasitol.** 67(1):59-68, 1994.

NEBIE, I.; DIARRA, A.; OUEDRAOGO, A.; TIONO, A. B.; KONATE, A. T.; GANSANE, A.; SOULAMA, I.; COUSENS, S.; LEROY, O.; SIRIMA, S. B. Humoral and cell-mediated immunity to MSP3 peptides in adults immunized with MSP3 in malaria endemic area, Burkina Faso. **Parasite Immunol.** 31(8):474-80, 2009.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L.; TAUIL, P. L.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malar J.** 9(1):115, 2010.

OPIE, E. L.; FREUND, J. An Experimental study of protective inoculation with heat killed tubercle bacilli. **J. Exp. Med.** 66(6):761-788, 1937.

PERLAZA, B. L.; VALENCIA, A. Z.; ZAPATA, C.; CASTELLANOS, A.; SAUZET, J. P.; BLANC, C.; COHEN, J.; ARÉVALO-HERRERA, M.; CORRADIN, G.; HERRERA, S.; DRUILHE, P. Protection against *Plasmodium falciparum* challenge induce in Aotus monkey by liver-stage antigen-3-derived long synthetic peptides. **Eur J Immunol.** 38(9):2610-5, 2008.

POLLEY, S. D.; TETTEH, K. K.; LIOYD, J. M.; AKPOGHENETA, O. J.; GREENWOOD, B. M.; BOJANG, K. A.; CONWAY, D. J. *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 3 is a Target of Allele-Specific Immunity and Alleles Are Maintained by Natural Selection. **J Infect Dis.** 195(2):279–87, 2007.

RAYNER, J. C.; CORREDOR, V.; FELDMAN, D.; INGRAVALLO, P.; IDERABDULLAH, F.; GALINSKI, M. R.; BARWELL, J. W. Extensive polymorphism in the *Plasmodium vivax* merozoite surface coat protein MSP-3 alpha is limited to specific domains. **Parasitology.** 125(5):393-405, 2002.

RAYNER, J. C.; HUBER, C. S.; FELDMAN, D.; INGRAVALLO, P.; GALINKI, M. R.; BARNWELL, J. W. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein PvMSP-3β is radically polymorphic through mutation and large insertions and deletions**. Infect Genet Evol.** 4(4):309-19, 2004.

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

RICHARDS, J. S.; BEESON, J. G. The future for blood-stage vaccines against malaria**. Immunol Cell Biol.** 87(5):377-90, 2009.

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.** 92(3):259-68, 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, N. E.; RODRIGUES, M. M. Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (Callithrix jacchus jacchus). **Microbes Infect.** 8(8):2130-7, 2006.

ROSA, D. S.; BASTOS, K. R.; BARGIERI, D. Y.; TZELEPIS, F.; NOMIZO, A.; RUSSO, M.; SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Role of interferon-gamma during CpG oligodeoxynucleotide-adjuvanted immunization with recombinant proteins. **Vaccine.** 25(32):6007-17, 2007.

RYAN, J. R.; STOUTE, J. A.; AMON, J.; DUNTON, R. F.; MTALIB, R.; KOROS, J.; OWOUR, B.; LUCKHART, S.; WIRTZ, R. A.; BARNWELL, J. W.; ROSENBERG, R. Evidence for transmition of Plasmodium vivax among a duffy antingen negative population in Western Kenya. **Am J Trop Med Hyg.** 75(4):575-81, 2006.

SALK, J. E. An interpretation of the significance influenza virus variation for the development of an effective vaccine. **Bull N Y Acad Med.** 28(11):748-65, 1952.

SCHOFIELD, L.; GRAU, G. E. Immunological processes in malaria pathogenesis. **Nat Rev Immunol.** 5(9):722-35, 2005.

SINGH, B.; KIM SUNG, L.; MATUSOP, A.; RADHAKRISHNAN, A.; SHAMSUL, S. S.; COX-SINGH, J.; THOMAS, A.; CONWAY, D.J. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet.** 363(9414):1017-24, 2004.

SIRIMA, S. B.; NÉBIÉ, I.; OUÉDRAOGO, A.; TIONO, A. B.; KONATÉ, A. T.; GANSANÉ, A.; DERMÉ, A. L.; DIARRA, A.; OUÉDRAOGO, A.; SOULAMA, L.; CUZZIN-OUTTARA, N.; COUSENS, S.; LEROY, O. Safety and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 long synthetic peptide (MSP3-LPS) malaria vaccine in health, semi-immune adult males in Burkina Faso, West África. **Vaccine.** 25(14):2723-32, 2007.

SMITH, K. D.; ANDERSEN-NISSEN, E.; HAYASHI, F.; STROBE, K.; BERGMAN, M. A.; BARRETT, S. L.; COOKSON, B. T.; ADEREM, A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. **Nat Immunol.** 4(12):1247-53, 2003.

SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from Pichia pastoris. **Parasitology.** 124(3):237-46, 2002.

STOUTE, J. A.; SLAOUI, M.; HEPPNER, D. G.; MOMIN, P.; KESTER, K. E.; WELLDE, B. T.; GARÇON, N.; KRZYCH, U.; MARCHAND, M. A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. **N Engl J Med.** 336(2):86-91, 1997.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J. M.; MERARD, R.; HEUSSLER, V. T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science.** 313(5791):1287-90, 2006.

TEMPLETON, T. J.; KASLOW, D. C. Cloning and cross-species comparison of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene from *Plasmodium knowlesi, Plasmodium vivax* and *Plasmodium gallinaceum*. **Mol Biochem Parasitol.** 84(1):13-24, 1997.

TRITTO, E.; MOSCA, F.; DE GREGORIO, E. Mechanism of action of licenced vaccine adjuvants. Vaccine. 27(25-26):3331-4, 2009.

TSAI, C. W.; DUGGAN, P. F.; JIN, A. J.; MACDONALD, N. J.; KOTOVA, S.; LEBOWITZ, J.; HURT, D. E.; SHIMP, RL. Jr.; LAMBERT, L.; MILLER, L. H.; LONG, C. A.; SAUL, A.; NARUM, D. L. Characterization of a protective Escherichia coli-expressed *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 indicates a non-linear, multi-domain structure. **Mol Biochem Parasitol.** 164(1):45-56, 2009.

TSUBOI, T.; TACHIBANA, M.; KANEKO, O.; TORII, M. Transmission-blocking vaccine of vivax malaria. **Parasitol Int.** 52(1):1-11, 2003.

TUJERA, R. Malaria – an overview. **Febs J.** 274(18):4670-9, 2007.

ULANOVA, M.; TARKOWSKI, A.; HAHN-ZORIC, M.; HANSON, L. A. The common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. **Infect Immun.** 66(2):1151-9, 2001.

VARGAS-SERRATO, E.; BARNWELL, J. W.; INGRAVALLO, P.; PERLER, F. B.; GALINSKI, M. R. Merozoite surface protein-9 of *Plasmodium vivax* and related simian parasites is orthologous to p101/ABRA of *P. falciparum*. **Mol Biochem Parasitol.** 120(1):41-52, 2002.

WACK, A.; RAPPUOLI, R. Vaccinology at the beginning of the 21st century. **Curr Opin Immunol.** 17(4):411-8, 2005.

WEIMER, E. T.; ERVIN, S. E.; WOZNIAK, D. J.; MIZEL, S. B. Immunization of young African green monkeys with OprF epitope 8-Oprl-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of prtective antibodies against nonmucoid Pseudomonas aeruginosa. **Vaccine.** 27(48):6762-9, 2009.

WHITE, N. J. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite**. Clin Infect Dis**. 46(2):172-3, 2008.

World Malaria Day – WHO – 2010. http://rbm.who.int/worldmalariaday. (Acessado em 08/09/2010).

World Malaria Report – WHO - 2008. www.who.int/malaria. (Acessado em 18/04/ 2010).

WU, X.; GOWDA, N. M.; KUMAR, S.; GOWDA, D. C. Protein_DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. **J. Immunol.** 184(8):4338-48, 2010.

YAMAUCHI, L. M.; COPPI, A.; SNOUNOU, G.; SINNIS, P. *Plasmodium* sporozoites trickle out the injection site. **Cell Microbiol.** 9(5):1215-22, 2007.

YESHIWONDIM, A. K.; GOPAL, S.; HAILEMARIAM, A. T.; DENGELA, D. O.; PATEL, H. P. Spatial analysis of malaria incidence at the village level in áreas with unstable transmission in Ethiopia. **Int J Health Geogr.** 26(8):5, 2009.

YU, Y.; ZENG, H.; LYONS, S.; CARLSON, A.; MERLIN, D.; NEISH, A. S.; GEWIRTZ, A. T. TLR5- mediated activation of p38 MAPK regulates epithelial IL-8 expression via posttranscriptional mechanism. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 285(2):G282-90, 2003.

VIII. ANEXOS

A.1. Comparação da resposta de anticorpos IgG de camundongos BALB/c após imunização com cada uma das proteínas recombinantes baseadas na MSP-3 na presença de ACF/AIF.

ACF/AIF		MSP-3α (FP-1)			MSP-3β (FP-1)			MSP-3β (FP-2)			MSP-3β (FP-3)		
		1ª	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**
MSP-3α (FP-1)	**1ª**		**	***	ns			***			**		
	2ª			ns		ns			ns			ns	
	3ª						ns			ns			ns
MSP-3β (FP-1)	**1ª**					ns	ns	***			***		
	2ª						ns		ns			ns	
	3ª									ns			ns
MSP-3β (FP-2)	**1ª**								***	***	ns		
	2ª									ns		***	
	3ª												ns
MSP-3β (FP-3)	**1ª**											***	***
	2ª												ns
	3ª												

ns = não significativo P>0,05, (*) = P<0,05, (**) = P< 0,01 e (***) = P<0,001.

A.2. Avaliação comparativa da resposta de anticorpos IgG induzida em camundongos *Wild Type* e *Knockout* (TLR4/LPS -) imunizados com as proteínas recombinantes baseadas na MSP-3 na ausência de adjuvante.

MSP-3α (FP-1)		*Knockout* (TLR4/LPS -)			*Wild Type*		
		1ª	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**
Knockout (TLR4/LPS-)	**1ª**		ns	ns	ns		
	2ª			ns		ns	
	3ª						ns
Wild Type	**1ª**					ns	ns
	2ª						ns
	3ª						

MSP-3β (FP-1)		*Knockout* (TLR4/LPS -)			*Wild Type*		
		1ª	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**
Knockout (TLR4/LPS-)	**1ª**		ns	***	ns		
	2ª			***		ns	
	3ª						ns
Wild Type	**1ª**					*	***
	2ª						***
	3ª						

MSP-3β (FP-2)		*Knockout* (TLR4/LPS -)			*Wild Type*		
		1ª	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**
Knockout (TLR4/LPS-)	**1ª**		ns	***	ns		
	2ª			***		ns	
	3ª						*
Wild Type	**1ª**					***	***
	2ª						***
	3ª						

MSP-3β (FP-3)		*Knockout* (TLR4/LPS -)			*Wild Type*		
		1ª	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**
Knockout (TLR4/LPS-)	**1ª**		ns	ns	ns		
	2ª			ns		ns	
	3ª						ns
Wild Type	**1ª**					ns	***
	2ª						***
	3ª						

ns = não significativo P>0,05, (*) = P<0,05, (**) = P< 0,01 e (***) = P<0,001.

A.3. Comparação da resposta de anticorpos IgG de camundongos BALB/c após imunização com a proteína recombinante MSP-3α (FP-1) na presença de diferentes adjuvantes.

MSP-3α (FP-1)		Alum			FliC			CpG ODN 1826			Quil A			TiterMax			AIF		
		1ª	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**
Alum	**1ª**		ns	ns	ns			ns			***			***			***		
	2ª			ns		ns			**			***			***			***	
	3ª						ns			***			***			***			***
FliC	**1ª**					ns	***	ns			***			***			***		
	2ª						ns		ns			***			***			***	
	3ª									*			***			***			***
CPG ODN 1826	**1ª**								***	***	***			***			***		
	2ª									**		***			***			***	
	3ª												***			***			***
Quil A	**1ª**											***	***	*			***		
	2ª												**		ns			ns	
	3ª															ns			ns
TiterMax	**1ª**														ns	***	ns		
	2ª															*		ns	
	3ª																		ns
AIF	**1ª**																	ns	***
	2ª																		***
	3ª																		

ns = não significativo P>0,05, (*) = P<0,05, (**) = P< 0,01 e (***) = P<0,001.

A.4. Comparação da resposta de anticorpos IgG de camundongos BALB/c após imunização com a proteína recombinante MSP-3β (FP-3) na presença de diferentes adjuvantes.

MSP-3β (FP-3)		Alum			FliC			CpG ODN 1826			Quil A			TiterMax			AIF		
		1ª	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**
Alum	**1ª**		***	***	ns			ns			*			***			***		
	2ª			ns		ns			***			***			***			***	
	3ª						*			***			***			***			***
FliC	**1ª**					***	***	ns			*			***			***		
	2ª						***		***			***			***			***	
	3ª									ns			**			ns			***
CPG ODN 1826	**1ª**								***	***	**			***			***		
	2ª									ns		ns			**			***	
	3ª												ns			ns			*
Quil A	**1ª**											***	***	***			***		
	2ª												ns		ns			ns	
	3ª															ns			ns
TiterMax	**1ª**														***	**	ns		
	2ª															ns		ns	
	3ª																		ns
AIF	**1ª**																	***	***
	2ª																		ns
	3ª																		

ns = não significativo P>0,05, (*) = P<0,05, (**) = P< 0,01 e (***) = P<0,001.

A.5. Comparação da resposta de anticorpos IgG de camundongos BALB/c após imunização com a proteína recombinante MSP-3β (FP-3) na presença das diferentes combinações de adjuvantes.

MSP-3β (FP-3)		Alum			FliC			CpG ODN 1826			Alum + CpG ODN 1826			FliC + CpG ODN 1826		
		1ª	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**	**1ª**	**2ª**	**3ª**
Alum	**1ª**		***	***				ns			***					
	2ª			ns					***			***				
	3ª									***			***			
FliC	**1ª**					***	***	ns						***		
	2ª						***		***						***	
	3ª									ns						***
CPG ODN 1826	**1ª**								***	***	***			***		
	2ª									ns		ns			ns	
	3ª												ns			***
Alum + CpG ODN 1826	**1ª**											***	***	ns		
	2ª												ns		ns	
	3ª															ns
FliC + CpG ODN 1826	**1ª**														***	***
	2ª															ns
	3ª															

ns = não significativo P>0,05, (*) = P<0,05, (**) = P< 0,01 e (***) = P<0,001.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 85/2006

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto "**Imunizações pré-clínicas utilizando proteínas recombinantes baseadas em antígenos da superfície de merozoitas de Plasmodium vivax**" (Protocolo CEEA nº112), sob a responsabilidade da Profa. **Irene da Silva Soares**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 10/07/2006.*

São Paulo, 07 de dezembro de 2006.

Profa. Dra. Ligia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rungo@usp.br