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

Imunizações pré-clínicas contra malária baseadas no Antígeno
1 de Membrana Apical (*PvAMA-1*): testes de protocolos
homólogos e heterólogos de indução e reforço utilizando DNA
plasmidial e/ou proteína recombinante

Elaine Cristina Matos Vicentin

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2011

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

Imunizações pré-clínicas contra malária baseadas no Antígeno
1 de Membrana Apical (*PvAMA-1*): testes de protocolos
homólogos e heterólogos de indução e reforço utilizando DNA
plasmidial e/ou proteína recombinante

Elaine Cristina Matos Vicentin

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2011

Elaine Cristina Matos Vicentin

Imunizações pré-clínicas contra malária baseadas no Antígeno 1 de Membrana Apical (*PvAMA-1*): testes de protocolos homólogos e heterólogos de indução e reforço utilizando DNA plasmidial e/ou proteína recombinante.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Irene da Silva Soares
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 02 de março de 2012.

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

**"Seja você quem for, seja qual for a
posição social que você tenha na vida,
a mais alta ou a mais baixa,
tenha sempre como meta muita força,
muita determinação e sempre faça tudo
com muito amor e com muita fé em
Deus, que um dia você chega lá.
De alguma maneira você chega lá."**

Ayrton Senna

Dedicatória

A Deus, por ser a base da minha vida.

Aos meus pais pelo amor incondicional, pelo apoio constante, pelo incentivo ao estudo e principalmente pela compreensão em todos os momentos difíceis.

Aos meus irmãos (Rita, Eduardo e Claudio) e meus cunhados (Hélio e Juliana) pelo carinho, pela amizade e incentivo constante.

Dedicatória

Ao meu marido Willian, por todo amor, companheirismo, carinho, ajuda constante nessa caminhada! Com certeza o seu apoio foi fundamental para a conclusão de mais esta etapa na minha vida! TE AMO!

À Kátia Sanches Françoso, pela amizade verdadeira desde o primeiro dia que nos conhecemos. Por estar presente sempre em minha vida, pelo incentivo e por nunca me deixar abater pelas dificuldades!

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Irene da Silva Soares pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, pela confiança em mim depositada e principalmente pela sua contribuição em minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Maurício Martins Rodrigues, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP-CTCMol por toda a colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sandro R. de Almeida, a Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa e a Prof. Dra. Gisele Monteiro de Souza, pelas sugestões e críticas na banca de qualificação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao pesquisador Paulo Lee Ho, do Instituto Butantan, por nos facilitar o acesso ao MPLA.

Ao professor Dr. Luís Carlos Ferreira do Departamento de Microbiologia, ICB/ USP por nos fornecer a Flagelina – FliC (*Salmonella Typhimurium*).

As amigas do Laboratório de Parasitologia: Luciana Lima, Mayne Pereira, Patrícia Ostermayer e Victória Simão, meu muito obrigada! Eu só tenho a agradecer a companhia de vocês todos os dias! Muito obrigada pelas conversas, conselhos, ajudas, risadas, companheirismo e dedicação. Tenho certeza, que meus dias se tornaram mais leves por ter vocês ao meu lado!

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação Ana, Dora, Sueli, Edna, Jorge e Elaine pelos serviços prestados, por todas as conversas e por sempre me ajudarem quando eu mais precisei!

As funcionárias do Biotério IQ-FCF/USP: Fátima e Flávia. Muito obrigada por toda ajuda sempre!

Às meninas: Soninha, Karen, Renatinha, pela amizade, companhia e ajuda sempre que solicitada.

Aos professores do departamento de análises clínicas e seus alunos, pela utilização de equipamentos, reagentes, pelos ensinamentos e pela disponibilidade.

Aos meus amigos, Daniela, Wagner, Jéssica, Michela, Denis, Adriana, Naoto, Rafaela, Roberta, Valner por sempre torcerem por mim!

E aos demais, que aqui não estão citados, mas que sempre me ajudaram positivamente ao longo da minha vida, meu muito obrigado!

SUMÁRIO

Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xii
Resumo	xiv
Abstract	xvi
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Aspectos Epidemiológicos da malária.....	2
2. Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	5
3. Estratégias de controle da malária.....	8
4. Antígeno alvo: Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1).....	11
4.1 AMA-1 de <i>Plasmodium</i> : estrutura e função.....	11
4.2. AMA-1 de <i>Plasmodium</i> : propriedades imunogênicas.....	14
4.3. AMA-1 de <i>Plasmodium vivax</i>	17
5. Protocolos de imunizações “Prime Boost”	21
6. Adjuvantes.....	24
6.1. Adjuvante Completo e Incompleto de Freund.....	25
6.2. Hidróxido de Alumínio.....	25
6.3. Quil A.....	27
6.4. MPLA.....	27
6.5. Flagelina (<i>Salmonella Typhimurium</i>) – (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 proteínas (SDS_PAGE).....	34

1.2. Meios de cultura para bactérias.....	34
1.3. Meios de cultura para <i>Pichia pastoris</i> e soluções estoque.....	35
1.4. Tampões utilizados para obtenção da proteína AMA-1 a partir do sobrenadante da expressão em <i>Pichia pastoris</i>	35
1.5. Soluções e tampões para para “immunoblotting”.....	35
1.6. Soluções e tampões para ensaios imunoenzimáticos (ELISA).....	36
1.7 Meios e Soluções utilizados para a cultura de células esplênicas.....	37
2. Geração dos plasmídios recombinantes contendo o gene ama-1 de <i>P. vivax</i>	37
2.1. Geração do plasmídio para expressão em células de mamíferos.....	37
2.2. Geração do plasmídio para expressão da proteína recombinante em <i>Pichia pastoris</i>	39
3. Preparo do plasmídio pPIC9K-ama-1 para integração na levedura <i>Pichia pastoris</i>	40
3.1. Preparação de bactérias competentes.....	40
3.2. Transformação de bactérias <i>E. coli</i>	40
3.3. Obtenção de DNA plasmidial através de Lise Alcalina.....	41
3.4. Linearização dos plasmídios.....	42
3.5. Preparação das leveduras competentes.....	43
3.6. Transformação por eletroporação.....	43
4. Estabelecimentos das condições de expressão e purificação da proteína recombinante a partir de <i>Pichia pastoris</i>	44
4.1. Seleção dos clones e análise da expressão protéica em pequena escala...	44
4.2. Expressão da proteína PvAMA-1 em média escala.....	45
5. População de estudo.....	46
6. Ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-PvAMA-1.....	47
6.1. Detecção da proteína recombinante AMA-1 por “immunoblotting”.....	47
6.2. ELISA para detecção de anticorpos anti-PvAMA-1 em soros de indivíduos com infecção patente por <i>P. vivax</i>	47

6.3. Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti- <i>PvAMA-1</i> em camundongos imunizados.....	48
7. Adjuvantes.....	50
8. Imunizações experimentais.....	50
9. Ensaio de Imunofluorescência Indireta.....	53
10. Análise da resposta celular induzida pela imunização com <i>PvAMA-1</i>	54
10.1. Detecção de IFN- γ no sobrenadante de cultura de células por ELISA de captura.....	54
10.2. Análise da resposta proliferativa de células esplênicas de camundongos imunizados.....	56
10.3. Detecção intracelular de citocinas em camundongos imunizados com a proteína AMA-1 na presença de diferentes adjuvantes.....	57
11. Preparo das <i>beads</i> para ajuste das voltagens.....	58
12. Proteína AMA-1 produzida em Boas Práticas de Laboratório (BPL).....	59
12.1. Produção, purificação e caracterização da proteína AMA-1 de <i>P. vivax</i>	59
12.2. Eletroforese em gel gradiente SDS-PAGE 8-25 no sistema Phast System.	60
12.3. Immunoblotting utilizando anticorpo Anti-His	61
12.4. Eletroforese em gel IEF- Focalização Isoelétrica por PI (Ponto Isoelétrico), no sistema Phast System.....	62
12.5. Eletroforese em gel gradiente SDS-PAGE 8-25 no sistema Phast System.....	62
12.6. Quantificação de proteínas pelo método BCA.....	63
12.7. Ensaio Microbiológico de “Bioburden”	63
12.8. Ensaio Cinético – cromogênico de detecção de endotoxina (K-QCL).....	63
13. Imunizações experimentais com a proteína <i>PvAMA-1</i> produzida em Boas Práticas de Laboratório.....	64
14. Análise estatística.....	65
IV. Resultados.....	66
1. Obtenção da proteína recombinante baseada no ectodomínio de AMA-1 de <i>P. vivax</i> a partir de <i>Pichia pastoris</i>	67

2. Avaliação comparativa do reconhecimento imune das proteínas recombinantes baseadas em AMA-1 produzidas em bactérias e leveduras por anticorpos IgG de indivíduos com infecção patente por <i>P. vivax</i>	69
3. Avaliação da Imunogenicidade do antígeno AMA-1 em camundongos imunizados.....	71
3.1. Avaliação do efeito da administração do antígeno AMA-1 em camundongos utilizando protocolos homólogos e heterólogos de indução e reforço com DNA plasmidial e/ou proteína recombinante.....	71
3.2 Avaliação do efeito da administração simultânea dos antígenos AMA-1 e FliC-MSP119-PADRE em camundongos, na ausência de adjuvantes.....	73
3.3 Imunizações em camundongos BALB/c utilizando testes de protocolos homólogos de indução e reforço com a proteína recombinante AMA-1 em diferentes adjuvantes.....	76
4. Reconhecimento da proteína nativa expressa em merozoítos de <i>P. vivax</i> por anticorpos anti-AMA-1.....	79
5. Avaliação da resposta imune celular induzida em camundongos após imunização com o antígeno PvAMA-1.....	80
5.1. Detecção de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de células esplênicas estimuladas com AMA-1.....	80
6. Análise da resposta proliferativa de células esplênicas de camundongos imunizados.....	82
7. Detecção intracelular de citocinas em camundongos imunizados com a proteína AMA-1 na presença de diferentes adjuvantes.....	84
8. Produção de AMA-1 em Boas Práticas de Laboratório pela companhia Farmacore.....	91
8.1. Eletroforese em gel gradiente SDS-PAGE 8-25 no sistema Phast System..	91
8.2. Immunoblotting utilizando anticorpo Anti-His.....	91
8.3. Ensaio Microbiológico de “Bioburden”.....	92
8.4. Ensaio cinético – cromogênico de detecção de endotoxina (K-QCL).....	92
9. Imunizações experimentais com a proteína AMA-1 produzida em Boas Práticas de Laboratório.....	93
V. DISCUSSÃO.....	96
VI. CONCLUSÕES.....	108
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

VIII. ANEXOS..... 124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição Geográfica da Malária no Mundo (WHO, 2010).....	3
Figura 2. Ciclo biológico do <i>P. vivax</i>	7
Figura 3. Representação esquemática da estrutura da proteína AMA-1 de <i>Plasmodium</i>	12
Figura 4. Representação esquemática do plasmídio recombinante plgSP-Pvama-1.....	38
Figura 5. Representação esquemática da fase de leitura aberta da seqüência presente no vetor pPIC9K para expressão em <i>Pichia pastoris</i>	40
Figura 6. Análise da expressão da proteína recombinante AMA-1 produzida em <i>Pichia pastoris</i>	68
Figura 7. Análise da proteína recombinante AMA-1 purificada.....	69
Figura 8: Análise por immunoblotting da proteína recombinante AMA-1 em condições não redutoras (NR) e redutoras(R).....	70
Figura 9. Avaliação comparativa do reconhecimento das proteínas AMA-1 (<i>E. coli</i>) e AMA-1 (<i>Pichia pastoris</i>) por soros humanos.....	71
Figura 10. Análise da resposta de anticorpos IgG após a imunização de camundongos com a proteína recombinante AMA-1 e/ou DNA plasmidial.....	73
Figura 11. Avaliação da resposta de anticorpos IgM e isotipos de IgG em camundongos imunizados com PvAMA-1.....	75
Figura 12. Avaliação da resposta de anticorpos IgG contra a proteína AMA-1 (A) e MSP1 ₁₉ (B) após a imunização de camundongos com a proteína recombinante AMA-1 e/ou FliC-MSP1 ₁₉ -PADRE.....	77
Figura 13. Comparação da resposta de anticorpos IgG após a imunização de camundongos com a proteína recombinante AMA-1 em diferentes adjuvantes...	79
Figura 14. Comparação do perfil de subclasses IgG após a imunização de camundongos com a proteína recombinante AMA-1 e diferentes adjuvantes.....	80
Figura 15. Ensaio de Imunofluorescência indireta com soros de camundongos BALB/c após imunizações com a proteína recombinante AMA-1 na presença do adjuvante MPLA ou Quil A.....	81
Figura 16. Análise da secreção de IFN- γ no sobrenadante de cultura celular.....	82
Figura 17. Estratégia de análise utilizada para avaliação da proliferação celular através de ensaio com CFSE.....	84
Figura 18. Análise da resposta proliferativa de células esplênicas de animais imunizados com diferentes adjuvantes.....	86

Figura 19. Estratégia de análise utilizada para detecção intracelular de citocinas em camundongos imunizados.....	87
Figura 20. Análise da produção de IL-2 por células esplênicas de animais imunizados com AMA-1.....	88
Figura 21. Análise da produção de TNF- α por células esplênicas de animais imunizados com AMA-1.....	89
Figura 22. Análise da produção de IFN- γ por células esplênicas de animais imunizados com AMA-1.....	90
Figura 23. Análise da proteína recombinante AMA-1 purificada.....	92
Figura 24: Análise por immunoblotting da proteína recombinante AMA-1.....	93
Figura 26. Comparação da resposta de anticorpos IgG após a imunização de camundongos com a proteína recombinante AMA-1 produzida em boas práticas de laboratório em diferentes adjuvantes.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Candidatos à vacina contra <i>P. vivax</i> atualmente em desenvolvimento.....	11
Tabela 2. Sumário dos resultados de imunizações experimentais baseadas em AMA-1 de <i>Plasmodium</i>	18
Tabela 3. Resposta imune induzida por adjuvantes.....	28
Tabela 4. Esquema de imunizações: testes de protocolos homólogos e heterólogos de indução e reforço com PvAMA-1	52
Tabela 5. Esquema de imunizações: testes de protocolos homólogos de indução e reforço com PvAMA-1e FliC-MSP1 ₁₉ -PADRE.....	52
Tabela 6. Esquema de imunizações: testes de protocolos homólogos de indução e reforço com PvAMA-1 em diferentes adjuvantes.....	53
Tabela 7. Esquema de imunizações dos camundongos utilizados para os experimentos de citometria de fluxo.....	58
Tabela 8. Fluorocromos utilizados nos experimentos de citometria de fluxo.....	58
Tabela 9. Esquema de imunizações: testes de protocolos homólogos de indução e reforço com PvAMA-1 produzida em BPL em adjuvantes selecionados.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
Alum	Hidróxido de Alumínio
Amp	Ampicilina
BMGY	<i>Buffered Glycerol Complex Medium</i>
BMMY	<i>Buffered Methanol Complex Medium</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
β -ME	β -mercaptoetanol
DBP	<i>Duffy Binding Protein</i>
DO	Densidade óptica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FliC	Flagelina C (<i>Salmonella</i> Typhimurium)
IgG	Imunoglobulina G
IPA	Índice Parasitário Anual
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactoside
LB	Luria Bertani
LSP	<i>Long Synthetic Peptides</i>
MD	Meio mínimo com glicose
MM	Meio mínimo com Metanol
OPD	σ -Phenylenediamine
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
Rec	Proteína recombinante
RNAse	Ribonuclease

RON	Proteína da Roptria
rpm	Rotações por minuto
s.c	subcutânea
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SEM	Erro Padrão da Média
T.A	Temperatura ambiente
TLR	Toll like receptor
TEMED	N,N,N',N' tetrametil etilenodiamida
Tris	Hidroximetilaminometano
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

RESUMO

VICENTIN, E. C. M. Imunizações pré-clínicas contra malária baseadas no Antígeno 1 de Membrana Apical (PvAMA-1): testes de protocolos homólogos e heterólogos de indução e reforço utilizando DNA plasmidial e/ou proteína recombinante. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. p 132, 2011.

O Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) é um dos mais promissores candidatos a vacina contra a fase sanguínea da malária. No presente estudo, geramos uma nova proteína recombinante baseada no ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax* (PvAMA-1) a partir do gene sintético com códon otimizado para expressão secretada na levedura *Pichia pastoris*. Por ELISA, a proteína PvAMA-1 foi reconhecida por 62,5% dos soros de pacientes da Amazônia brasileira infectados por *P. vivax*. A imunogenicidade de PvAMA-1 foi avaliada em camundongos BALB/c, utilizando protocolos homólogos e heterólogos de indução e reforço com DNA plasmidial e/ou proteína recombinante, emulsificada em Adjuvante de Freund. Os resultados mostraram que a eficiência da imunização é dependente da presença da proteína emulsificada em adjuvante forte. As imunizações subsequentes foram realizadas com a proteína recombinante emulsificada em diferentes adjuvantes: sais de alumínio (Alum), Monophosphoryl Lipid A (MPLA) de *Bordetella pertussis*, flagelina FliC de *Salmonella Typhimurium*, saponina Quil A e Adjuvante Incompleto de Freund (AIF). Os resultados demonstraram que as imunizações na presença de Quil A e AIF foram capazes de induzir altos títulos de anticorpos IgG e uma resposta de isotipos de IgG mais balanceada, caracterizando um padrão do tipo Th1/Th2. Títulos de anticorpos mais baixos, mas também expressivos, foram obtidos na presença de Alum, MPLA, Alum + MPLA e Alum + FliC. A análise da resposta proliferativa, por citometria de fluxo utilizando marcação com CFSE, mostrou que células esplênicas CD3+CD4+, assim como CD3+CD8+, de animais imunizados com PvAMA-1 na presença dos adjuvantes Alum, Alum + MPLA, Quil A e AIF foram capazes de proliferar especificamente *in vitro*. Por imunofluorescência, soros policlonais de camundongos imunizados com o antígeno na presença de MPLA e Quil A foram capazes de reconhecer a proteína nativa expressa em isolados de *P. vivax* da Ásia. Visando futuros testes pré clínicos em primatas não humanos, a proteína PvAMA-1 foi produzida em boas práticas de laboratório (BPL) por uma companhia especializada e o potencial imunogênico da proteína foi confirmado em

imunizações posteriores. Em conjunto, nossos resultados demonstram que *PvAMA-1* é um antígeno promissor para ser explorado em protocolos de imunização contra malária *vivax*, individualmente, ou em combinação com outros antígenos.

ABSTRACT

VICENTIN, E. C. M. Pre-clinical immunizations against malaria based on the Apical Membrane Antigen 1 (*PvAMA-1*): Testing prime-boost homologous and heterologous protocols using DNA and/or recombinant protein. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo. p 142, 2011

The Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1) is one of the most promising vaccine candidates against the erythrocytic stage of malaria. In the present study we generated a new recombinant protein based on AMA-1 ectodomain of *P. vivax* (*PvAMA-1*) using a synthetic codon optimized gene for yeast secreted expression. By ELISA, the protein *PvAMA-1* was recognized by 62,5% of the sera from Brazilian Amazonia patients infected by *P. vivax*. The immunogenicity of *PvAMA-1* was evaluated in BALB/c mice using homologous and heterologous protocols of prime and boost with plasmidial DNA and/or recombinant protein emulsified in Freund adjuvant. The results showed that the efficiency of immunization is dependent on the presence of a strong adjuvant. The following immunizations were conducted using the protein emulsified in different adjuvants: aluminium salts (Alum), Monophosphoryl Lipid A (MPLA) of *Bordetella pertussis*, flagelin FliC of *Salmonella* Typhimurium, saponin Quil A and Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). The results showed that immunizations in the presence of Quil A e IFA were able to induce high IgG titers and a more balanced IgG isotypes response, featuring a standard type Th1/Th2. Lower antibody titers, but also significant, were obtained in the presence of Alum, MPLA, Alum + MPLA and Alum + FliC. The proliferative cellular analysis, by flow cytometry using CFSE staining, showed that splenic cells CD3+CD4+, as well as CD3+CD8+ from immunized mice that received *PvAMA-1* with Alum, Alum + MPLA, Quil A and IFA were specifically able to proliferate *in vitro*. By immunofluorescence, the polyclonal sera from mice immunized with the antigen in the presence of MPLA and Quil A were able to recognize native protein expressed in Asian *P. vivax* isolates. Aiming future pre-clinical assays in non-human primates, the protein *PvAMA-1* was produced in good laboratory practices (GLP) conditions by a specialized company and its immunogenic efficiency was confirmed in later immunizations. Altogether, our results showed that *PvAMA-1* is a promissor antigen to be explored in immunization protocols against *vivax* malaria, individually, or combined with other antigens.

I. INTRODUÇÃO

1. Aspectos epidemiológicos da malária

A malária é um dos principais problemas de saúde pública em diferentes regiões do mundo, e se não for tratada de imediato com medicamentos eficazes, pode muitas vezes ser fatal. É causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, da família Plasmodiidae, filo Apicomplexa, que infecta alternadamente um hospedeiro vertebrado e um invertebrado (REY, 1991).

Anualmente ocorrem de 250 a 500 milhões de casos e 1 a 3 milhões de pessoas morrem. Existem cinco espécies de *Plasmodium* que infectam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. Esta última espécie, conhecida por infectar macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), vem sendo diagnosticada em residentes do sudeste da Ásia, onde vinha sendo diagnosticada erroneamente como *P. malariae* (SINGH et al., 2004; COX-SINGH et al., 2008). Dentre essas espécies, o *P. falciparum* é o mais prevalente no mundo (91% do total de casos) seguido pelo *P. vivax* (WHO, 2010).

A infecção é um problema grave especialmente na África, onde 1 em cada 5 óbitos na infância é devido aos efeitos da doença. Uma criança Africana tem em média entre 1,6 e 5,4 episódios de febre de malária a cada ano (WHO, 2010). A Figura 1 apresenta a distribuição geográfica da malária no mundo.

A quantidade exata de casos de malária causada pelo *P. vivax* ainda não foi precisamente estimada. HAY et al. (2004), revisto por PRICE et al. (2007) colocam que existem de 132 a 391 milhões de prováveis infecções e GUERRA et al. (2006) descreveram que cerca de 2,6 bilhões de pessoas vivem em situação de risco. A maior proporção de malária *vivax* em todo o mundo corresponde certamente ao sul e

sudeste da Ásia (provavelmente mais de 80% das infecções). A carga total de malária nas Américas parece ser baixa quando comparada a África, mas o *P. vivax* é responsável por 70% da malária e provoca muitos problemas socioeconômicos (revisto por MUELLER et al., 2009). Na maior parte da África Ocidental a malária *vivax* é pouco documentada devido ao fator Duffy negativo da população nativa. No entanto a transmissão da malária foi recentemente documentada em populações Duffy negativa no Quênia (RYAN et al., 2006), no Brasil (CAVASINI et al., 2007) e na República do Congo (CULLETON et al., 2009).

Figura 1. Distribuição Geográfica da Malária no Mundo (WHO, 2010).

No Brasil, estima-se que no início dos anos 40, cerca de 6 milhões de casos de malária ocorreram, principalmente por *P. falciparum*. Como resultado da luta contra a doença, o número de casos de malária diminuiu ao longo dos anos e o menor número de casos até o momento foi registrado em 1960. A partir de meados da década de 60, o Brasil passou por um processo de ocupação na Amazônia e este

movimento migratório levou a um aumento progressivo no número de casos notificados. Embora o principal mosquito vetor (*Anopheles darlingi*) esteja presente em cerca de 80% país, atualmente a incidência de malária no Brasil é quase que exclusivamente (99,8% dos casos), restrita à região da Bacia Amazônica, onde um número de fatores combinados favorece a transmissão de doenças e prejudica a utilização de procedimentos de controle padrão. O *P. vivax* é responsável por 83,7% dos casos registrados, enquanto o *P. falciparum* é responsável por 16,3% e *P. malariae* raramente é observado (revisto por OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

A malária *vivax* é conhecida por causar baixa mortalidade em comparação com a malária *falciparum*, que é responsável por grande parte da morbidade e de encargos enormes sobre as comunidades endêmicas. No entanto, nos últimos anos, um padrão incomum de complicações clínicas com casos fatais associados ao *P. vivax* têm sido relatados no Brasil, e este é um motivo de preocupação (revisto por OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). Além disso, o surgimento de cepas resistentes a cloroquina precisa ser mais investigado. O aparecimento de espécies de mosquitos resistentes à inseticidas e a resistência do parasito aos medicamentos anti-maláricos são alguns dos limitantes da erradicação (revisto por ARÉVALO-HERRERA et al., 2010; revisto por OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010).

O diagnóstico precoce e o tratamento são dois elementos básicos de controle da doença. O tratamento precoce e eficaz da malária pode reduzir a duração da infecção e evitar complicações, incluindo a grande maioria das mortes. O uso inadequado de medicamentos antimaláricos no século passado contribuiu para a resistência generalizada no parasito da malária a medicamentos como a cloroquina, levando ao aumento das taxas de doença e morte (Ministério da Saúde, 2005).

Nas últimas seis décadas a malária tem sido alvo de intensas campanhas que visam erradicar a transmissão do parasito através de medidas de controle de vetores e o uso de quimioterapias. Medidas de controle e de saneamento têm contribuído para a eliminação da malária em algumas áreas. Além disso, a eliminação do *P. vivax* possui desafios específicos, em particular as formas latentes do parasito (hipnozoítos), que possibilitam recaídas algum tempo depois que a parasitemia inicial foi eliminada (CARLTON et al., 2008).

2. Ciclo de vida do *Plasmodium*

A transmissão da malária ocorre através da picada da fêmea do mosquito infectada pelo *Plasmodium*. Os esporozoítos, formas infectantes do parasito, são inoculados na derme do homem sadio através da saliva da fêmea anofelina infectante (revisto por TUJERA, 2007). Estudos recentes utilizando parasitos 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 (AMINO et al., 2006; 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).

A partir do sistema circulatório, os esporozoítos são transportados para o fígado, onde após a invasão, se replicam no interior dos hepatócitos (MOTA; RODRIGUEZ, 2001). Para ter acesso aos eritrócitos, o merozoíto hepático deve chegar a luz dos sinusóides do fígado através do Espaço de Disse, uma matriz extracelular. Após a entrada do parasito na célula hospedeira, ocorre a diferenciação do esporozoíto em um esquizonte multinucleado e, eventualmente, em milhares de merozoítos, que futuramente poderão invadir uma célula vermelha do sangue (STURM et al., 2006).

O *P. vivax* possui características biológicas únicas. A Figura 2 apresenta o ciclo biológico do parasito, com a inclusão de características que se relacionam com o *P. vivax*. A característica mais óbvia que distingue o *P. vivax* do *P. falciparum* inclui o desenvolvimento de formas latentes, conhecidas como hipnozoítos no fígado, que causa uma subsequente infecção conhecida como recaída (revisto por MUELLER et al. 2009). Outra característica biológica notável do *P. vivax* é a sua preferência, se não exclusividade, de invadir somente reticulócitos.

O processo de invasão dos merozoítos nessas células pode ocorrer em quatro etapas: uma inicial, onde ocorre o reconhecimento e a fixação reversível do merozoíto à membrana eritrocitária; depois a reorientação e a liberação de substâncias das roptrias e micronema; o movimento de junção e invaginação da membrana do eritrócito em torno do merozoíto, acompanhada pela remoção do revestimento da superfície do merozoíto e por último a formação do vacúolo parasitóforo, após a conclusão da invasão do merozoíto (revisto por TUTEJA, 2007).

Figura 2. Ciclo biológico do *P. vivax*. Retirado da revisão de MULLER et al., 2009.

O ciclo eritrocítico inicia-se quando os merozoítos teciduais invadem os eritrócitos. O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito se dá por esquizogonia, com a consequente formação dos merozoítos, que se multiplicam por divisão binária, até que são liberados na circulação após a ruptura do eritrócito, para em seguida invadirem novos eritrócitos. Depois de algumas gerações de merozoítos sanguíneos, uma pequena parcela de parasitos se diferencia em gametócitos, que não mais se dividem e que seguirão o seu desenvolvimento no mosquito vetor, dando origem aos esporozoítos. O ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes, a cada 48 horas, nas infecções pelo *P. falciparum* e *P. vivax* e a cada 72 horas nas infecções pelo *P. malariae*.

A principal característica clínica da malária em indivíduos não imunes é o paroxismo malárico, constituído por febre, calafrios e cefaléia. Na malária causada pelo *P. vivax* a febre se repete quase que sincronicamente a cada 48 horas e a

infecção não costuma evoluir com aparecimento de complicações sistêmicas, daí ser chamada de febre terçã. Por outro lado, na malária causada pelo *P. falciparum* a febre é intermitente com periodicidade irregular, se repete a cada 48 horas e tem características de febre terçã maligna, pois a infecção tende a evoluir com complicações.

3. Estratégias de controle da malária

Durante as últimas seis décadas, a malária tem sido alvo de intensas campanhas que visam erradicar a transmissão do parasito por meio da aplicação de medidas de controle de vetores e uso de quimioterapia (WHO, 2010). Em regiões endêmicas de malária, os indivíduos permanentemente expostos a malária, eventualmente, desenvolvem manifestações clínicas mais brandas ou mesmo infecções assintomáticas. Embora esta imunidade não seja capaz de prevenir a infecção, os portadores assintomáticos do parasito não sofrem doença clínica grave ou morte, mas, podem contribuir significativamente para perpetuar a transmissão da malária em áreas endêmicas (revisto por ARREVALO-HERRERA et al., 2010).

Embora esses pacientes assintomáticos possam contribuir significativamente para perpetuar a transmissão da malária em áreas endêmicas, a imunidade destas comunidades fornece evidências indiretas para a viabilidade do desenvolvimento de uma vacina. Várias outras evidências em estudos sugeriram que uma vacina profilática contra a malária para os seres humanos é possível (revisto por ARREVALO-HERRERA et al., 2010). Em um estudo, onde indivíduos adultos do sexo masculino foram imunizados com esporozoítos irradiados de *P. vivax* e *P. falciparum*, a vacina mostrou-se segura e bem tolerada e conferiu proteção de 90%

contra a infecção, sendo que a proteção foi espécie/estágio específica, mas eficaz contra todas as cepas testadas além de um aumento nos títulos de anticorpos para a proteína circumsporozoíta (CLYDE, 1990).

Após repetidas exposições à infecções, pessoas que vivem em áreas endêmicas de malária adquirem gradualmente mecanismos para limitar a resposta inflamatória ao parasito. Crianças, que ainda necessitam desenvolver esses mecanismos de proteção imunológica, são, portanto, as que correm maior risco de desenvolver malária grave, além de viajantes de áreas não endêmicas, onde a malária grave é mais comum e as taxas de mortalidade são mais altas (ARTAVANIS-TSAKONAS et al., 2003).

Ainda que tenha sido proposto que o desenvolvimento intracelular do parasito é um mecanismo para fugir da resposta imune, fatores imunológicos são capazes de eliminar parasitos intracelulares dentro de hepatócitos e glóbulos vermelhos (HOFFMAN et al., 1996; RILEY et al., 2006). Durante as duas últimas décadas, a teoria aceita é que os parasitos podem ser alvos durante curtos períodos de tempo antes da invasão dos hepatócitos, fertilização de gametas ou reinvasão de eritrócitos (HOFFMAN e MILLER et al., 1996; HERRERA, 2005; GIRARD et al., 2007). De acordo com este conceito, vacinas que se destinam a fase pré-eritrocítica induziriam respostas mediadas por anticorpos que inibiriam a invasão de hepatócitos por esporozoítos (HOLLINGDALE, 1990). No entanto, alguns antígenos demonstraram retardar o desenvolvimento da fase de esquizontes hepáticos por parasitos através de resposta imunes citofílicas mediadas por células CD8⁺ ou citocinas, como IFN- γ (RODRIGUES et al., 1991, HAFALLA et al., 2011). Dado que a esquizogonia tecidual é assintomática e é seguida por manifestações clínicas da infecção, esta fase de

inibição poderia fornecer imunidade estéril (NUSSENZWEIG e NUSSENZWEIG, 1989). Durante o desenvolvimento assexuado do parasito, as vacinas podem induzir anticorpos específicos que bloqueiam a invasão do merozoito (HOLDER, 1996).

A vacina RTS,S, que tem como alvo a proteína Circunsporozoíta emulsificada no adjuvante AS01 (formulação contendo lipossomas, QS21 e MPL) têm mostrado consistente proteção contra a malária causada pelo *P. falciparum* em testes realizados na África (The RTS,S Clinical Trials Partnership, 2011). Atualmente a vacina se encontra em estudo de fase III, e resultados parciais publicados recentemente mostraram que essa vacina foi capaz de reduzir pela metade (50,4%) os episódios clínicos da doença, inclusive manifestações graves em crianças com idade entre 5 e 17 meses no período de um ano após a vacinação (AGNANDJI et al., 2011).

A busca de vacinas contra *P. vivax* continua sendo um desafio. No entanto, ao contrário do *P. falciparum*, poucos candidatos têm sido estudados. Atualmente existem apenas duas vacinas de subunidades sendo utilizadas em testes clínicos e um número modesto de outros candidatos sendo testados em testes pré-clínicos em comparação com o *P. falciparum*, que possui mais de 70 formulações diferentes e 23 em testes clínicos (revisto por MUELLER et al., 2009).

O desenvolvimento de uma vacina específica contra o *P. vivax* tem sido um grande desafio devido a recursos limitados e dificuldades técnicas, como o cultivo *in vitro* do parasito, mas, progressos importantes têm sido alcançados na identificação e caracterização de diferentes antígenos de *P. vivax* (HERRERA et al., 2007). Os mais importantes antígenos, candidatos a comporem uma vacina estão apresentados na Tabela 1.

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

Estágio do parasito	Antígeno	Tipo	Testes pré-clínicos em roedores	Testes pré-clínicos em primatas	Testes clínicos Fase 1
Pré-eritrocítico	CSP-N				
	CSP-R	LSP	Sim	Sim	Sim
	CSP-C	LSP	Sim	Sim	Sim
	SSP2/TRAP	LSP	Sim	Sim	Sim
	MSP1 (42/19)	LSP	Não	Não	Não
	Msp1 (200L)	REC	Sim	Sim	Não
Eritrocítico (assexuado)	MSP-9	REC	Sim	Não	Não
	DBP-RII	REC	Sim	Sim	Não
	AMA-1	REC	Sim	Sim	Não
Eritrocítico (sexuado)	<i>Pvs25</i>	REC	Não	Sim	Sim
Eritrocítico	<i>Pvs28</i>	REC	Não	Sim	Não
Combinação	CSP, SSP2, AMA-1, MSP-1	DNA	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*; *Pvs25* = *P. vivax Surface Protein 25*; MSP-9 = *Merozoite Surface Protein 9*; *Pvs28* = *P. vivax Surface Protein 28*.

4. Antígeno alvo: Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1)

4.1. AMA-1 de *Plasmodium*: estrutura e função.

AMA-1 é uma proteína transmembrana altamente conservada, presente em todas as espécies de *Plasmodium*. A estrutura de AMA-1 é formada por um ectodomínio rico em cisteínas, uma região transmembrana e uma região C-terminal. As pontes dissulfeto formadas pelas cisteínas promovem o dobramento do

ectodomínio em uma região N-terminal e três domínios (DI, DII e DIII), conforme ilustra a Figura 3 (revisto por REMARQUE et al., 2008). Esta proteína está localizada no pólo apical do merozoíto, nas organelas das roptrias e acredita-se ter um importante papel durante o processo de invasão. Após a ruptura do esquizonte, a proteína parece espalhar-se ao redor da superfície dos merozoítos (NARUM e THOMAS, 1994).

A estrutura cristalográfica desta proteína de *P. vivax*, foi elucidada em 2005, por PIZARRO et al., comprovando a presença dos três domínios, e que esses possuem 16 resíduos de cisteína que formam 8 ligações dissulfídicas, dos quais dois (I e II) formam módulos “PAN”, frequentemente associados a interações proteína-proteína e proteína-carboidrato.

Figura 3. Representação esquemática da estrutura da proteína AMA-1 de *Plasmodium*.

AMA-1 possui 83 kDa, e está presente nos micronemas, onde é hidrolisada na região N-terminal, sendo então transportada para a superfície do merozoíto como

uma proteína de 66 kDa (CREWETHER et al., 1990). Posteriormente, durante a invasão de eritrócitos, AMA-1 sofre nova clivagem gerando dois fragmentos de 48 e 44 kDa (HOWELL et al., 2001).

A invasão dos eritrócitos é um processo complexo, no qual inúmeras moléculas do parasito interagem com receptores da célula hospedeira. Esta invasão ocorre em três etapas: i) adesão do parasito ao eritrócito; ii) reorientação do parasito, direcionando o pólo apical para a membrana da célula hospedeira e iii) formação da junção e invasão. O primeiro contato ocorre em qualquer orientação e é mediado pelas proteínas da superfície do merozoíto (MSPs). Algumas delas (MSP1, 2, 4, 5, 8 e 10) se mantêm ancoradas na membrana pela âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol), enquanto MSP3, 6, 7 e 9 são solúveis e estão associadas à superfície do merozoíto (COWMAN; CRABB, 2006; GAUR; MAYER; MILLER, 2004). Essas proteínas possuem domínios ricos em cisteína, dentre estes, módulos do tipo EGF, os quais estão relacionados com interações protéicas (COWMAN; CRABB, 2006).

A segunda etapa para a invasão é a reorientação do merozoíto. A proteína AMA-1, parece ser a proteína chave dessa fase, uma vez que anticorpos contra essa proteína bloqueiam a reorientação, mas não interferem com a adesão inicial (MITCHELL et al., 2004). Após o processo de reorientação, ocorre a formação de uma junção entre as membranas do parasito e das hemácias. As moléculas que participam dessa fase de formação da junção estão mais bem caracterizadas e localizam-se nas roptrias e nos micronemas.

Recentemente, foi demonstrado, que durante a invasão de uma célula vermelha pelo *P. falciparum*, ocorre uma série de eventos e interações necessárias, como a secreção coordenada de proteínas presentes nos micronemas e nas

roptrias. A base molecular da invasão depende da secreção das proteínas das roptrias (complexo RON) dentro da célula hospedeira. RON2 é integrada na membrana plasmática e RONS 4 e 5 estão localizadas na face citoplasmática. A superfície exposta de RON2 serve como receptor para AMA-1, que está presente na superfície celular do parasito. O complexo montado AMA-1-RON forma uma estrutura em forma de anel conhecida como movimento de junção, levando à interiorização do parasito em um vacúolo parasitóforo. Além de ligar as membranas celulares, esse movimento de junção atua como uma barreira de difusão, colaborando para evitar a degradação intracelular dos parasitos (TONKIN et al., 2011).

AMA-1 e RONS 2, 4 e 5 são conservadas através do Filo Apicomplexa sugerindo um mecanismo de invasão amplamente conservado. Em apoio a essa afirmação, LAMARQUE et al. (2011), mostraram recentemente que a formação do complexo AMA-1-RON2 é importante no processo invasivo, tanto de *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum*.

4.2. AMA-1 de *Plasmodium*: propriedades imunogênicas.

Atualmente, existem vários grupos realizando testes pré-clínicos utilizando AMA-1 para imunizar camundongos contra *P. chabaudi* e *P. yoelii* e ainda, para imunizar macacos contra *P. knowlesi*, *P. fragile*, *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. cynomolgi*. Existem outras formas vacinais também sendo utilizadas, como peptídeos sintéticos, DNA plasmidial, vetores virais e virossomos, mas a maioria dos estudos concentram-se na proteína recombinante AMA-1, que necessita de um forte adjuvante para melhorar sua imunogenicidade (revisto por REMARQUE et al., 2008).

A Tabela 2 resume os dados de eficácia e proteção de vacinações com AMA-1. O potencial imunogênico de AMA-1 foi observado, inicialmente, após a imunização de macacos *Rhesus* com a proteína nativa purificada de *P. knowlesi*, a qual foi capaz de induzir proteção significativa contra a infecção (DEANS et al., 1988). Em outros estudos foi possível observar que anticorpos monoclonais contra AMA-1 de *P. knowlesi* foram capazes de inibir a invasão de merozoítos *in vitro* (THOMAS et al., 1984, 1994). Posteriormente, em 1996, CREWETHER et al., confirmaram esses resultados utilizando anticorpos policlonais de coelhos específicos contra AMA-1 de *P. chabaudi*, que foram capazes de transferir passivamente imunidade contra a infecção em camundongos. Em 1998, ANDERS et al., mostraram que a imunização de camundongos ou macacos com proteína recombinante derivada de AMA-1 de *P. chabaudi* foi capaz de induzir proteção significativa contra a infecção. URQUIZA et al. (2000) também demonstraram que peptídeos sintéticos de *PfAMA-1* inibem a interação do merozoíto com o eritrócito. Em outro trabalho, LI et al. (2002) demonstraram que peptídeos derivados de *PfAMA-1* inibiram a interação entre merozoítos e eritrócitos. Ainda em 2002, STOWERS et al., verificaram a eficiência protetora de AMA-1 de *P. falciparum*, expressa em *Pichia pastoris*, após a imunização em macacos *Aotus vociferans* seguido de um desafio com dose letal do parasito. A proteção induzida pela imunização foi considerada efetiva, pois foi capaz de manter a parasitemia baixa em relação ao grupo não imunizado. Além disso, já foi demonstrado que AMA-1 é também expresso nos micronemas de esporozoítos de *P. falciparum* e anticorpos específicos contra *PfAMA-1* foram capazes de inibir a invasão de hepatócitos (SILVIE et al., 2004).

Outras evidências que sugerem fortemente a importância dos anticorpos contra a AMA-1 na imunidade contra as formas sangüíneas do parasito foram obtidas por

meio de imunizações experimentais com proteínas recombinantes. Foi demonstrado que a imunização de coelhos com proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 foi capaz de induzir anticorpos capazes de inibir a invasão do merozoíto de *P. falciparum in vitro* (HODDER et al., 2001; DUTTA et al., 2002; KOCKEN et al., 2002; KENNEDY et al., 2002; LALITHA et al., 2004; DUTTA et al., 2005).

Em estudo clínico de Fase 1 realizado com uma mistura de AMA -1 das cepas 3D7 e FVO de *P. falciparum*, emulsificada no adjuvante Alhydrogel, foi possível observar que essa vacina teve uma boa tolerância e que induziu anticorpos IgG em 92% dos indivíduos após três imunizações (MALKIN et al., 2005). Posteriormente, em outro estudo clínico também realizado com a mesma mistura de AMA-1 das cepas 3D7 e FVO de *P. falciparum*, emulsificada em Alhydrogel + CPG 7909, foi observado que os efeitos adversos foram maiores após as três imunizações, mas a indução de anticorpos IgG foram até 14 vezes maiores do que as imunizações realizadas somente com a proteína em combinação com o Alhydrogel. Além disso, a adição do adjuvante CPG 7909 aumentou a inibição de crescimento *in vitro* de parasitos homólogos atingindo níveis de até 96% (MULLEN et al., 2008).

Com base nestes estudos, SAGARA et al. (2009), iniciaram um estudo com adultos expostos a malária, em um vilarejo chamado Donéguébougou, localizado em Mali. Esses voluntários receberam duas doses da vacina, emulsificada em Alhydrogel ou ainda emulsificada na combinação de Alhydrogel + CPG 7909. Após o esquema de vacinação, foi possível observar que ambas as vacinas foram bem toleradas, sendo que os indivíduos do grupo que recebeu a vacina com a combinação dos adjuvantes Alhydrogel + CPG 7909, apresentaram títulos de anticorpos duas vezes maiores do que os indivíduos que receberam a vacina somente com o Alhydrogel.

Em um estudo realizado recentemente, THERA et al. (2011) utilizaram a vacina FMP21/AS02A, baseada na proteína AMA-1 da cepa 3D7 de *P. falciparum*, em um estudo duplo-cego, randomizado, em 400 crianças em Mali, e como controle, utilizaram a vacina da raiva e os acompanharam por seis meses. A incidência acumulativa foi de 48,4% no grupo de vacinado com a vacina para a malária contra 54,4% no grupo controle. Reações locais e febre após a vacinação foram mais freqüentes no grupo que recebeu a vacina para a malária. Essa vacina não ofereceu proteção significativa contra a malária clínica.

4.3. AMA-1 de *P. vivax*

O gene que codifica a proteína AMA-1 é relativamente conservado entre as espécies de *Plasmodium* (FIGTREE et al., 2000). Variações significativas entre os alelos de *P. falciparum* foram observadas (KOCKEN et al., 2000, POLLEY e CONWAY et al., 2001; CORTES et al., 2003). Este polimorfismo, que resulta na substituição de aminoácidos, indica que AMA-1 sofre pressões imunes que resultam na diversificação da conformação dos epítomos impedindo, assim, a invasão de novos eritrócitos pelos merozoítos (HEALER et al., 2004).

A comparação da sequência de nucleotídeos de *ama-1* de *P. vivax* com *ama-1* de *P. knowlesi*, *P. fragile*, *P. chabaudi* e *P. falciparum* revelou que a identidade entre a sequência de *P. vivax* e das demais espécies é, respectivamente, de 86%, 83%, 57% e 52%. A baixa identidade entre a sequência de nucleotídeos de *ama-1* de *P. falciparum* se deve a uma inserção de 42 aminoácidos na região N-terminal da proteína AMA-1 de *P. falciparum* (CHENG & SAUL, 1994).

Tabela 2 - Sumário dos resultados de imunizações experimentais baseadas em AMA-1 de *Plasmodium*.

Espécie	Modelo	Tipo do Antígeno	Adjuvante	Resultado	Referência
<i>P. knowlesi</i>	Macaco	Proteína Nativa	Saponina	Proteção contra a infecção	DEANS et. al, 1988
<i>P. fragile</i>	Macaco	Proteína Recombinante	Baculovirus combinado com Montanide ISA 720	Proteção contra a infecção	COLLINS et. al, 1994
<i>P. chabaudi</i>	Camundongo	Proteína Recombinante	Montanide ISA 720	Proteção contra a infecção	CREWETHER et. al, 1996
<i>P. chabaudi</i>	Camundongo	Proteína Recombinante	Montanide ISA 720	Proteção contra a infecção	ANDERS et. al, 1998
<i>P. yoeli</i>	Camundongo	Proteína Nativa	-----	Proteção contra a infecção	NARUM et. al, 2000
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína Recombinante	Montanide ISA 720	Anticorpos capazes de inibir a invasão de eritrócitos <i>in vitro</i>	HODDER et. al, 2001
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína Recombinante	CFA, IFA	Inibição da invasão de eritrócitos por parasitos homólogos	KOCKEN et. al, 2002
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína Recombinante	Montanide ISA 720	Anticorpos capazes de bloquear o crescimento das cepas dos parasitos homólogos	KENNEDY et. al, 2002
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína Recombinante	Montanide ISA 720	Anticorpos capazes de inibir o crescimento do parasito <i>in vitro</i>	DUTTA et. al, 2002
<i>P. falciparum</i>	Macaco	Proteína Recombinante	CFA, IFA	Proteção contra a infecção	STOWERS et. al, 2002
<i>P. falciparum</i>	Coelho	Proteína Recombinante	Já citados anteriormente	Anticorpos capazes de inibir a invasão de eritrócitos / crescimento <i>in vitro</i>	HODDER et. al, 2001; STOWERS et. al, 2002; KOCKEN et. al, 2002; DUTTA et. al, 2002; KENNEDY et al. (2002), LALITHA et al. (2004), DUTTA et al. (2005)..
<i>P. vivax</i>	Camundongo	DNA Plasmidial	-----	Anticorpos reconhecem a proteína nativa por imunofluorescência	ROGERS et. al, 1999
<i>P. vivax</i>	Macaco	Proteína Recombinante	SBAS2	Altamente Imunogênica	KOCKEN et. al, 1999
<i>P. vivax</i>	Camundongo	Proteína Recombinante	CFA, IFA	Altamente Imunogênica	MUFALO et. al, 2008
<i>P. vivax</i>	Camundongo	Proteína Recombinante	CFA, IFA, Alum, Quil A, QS21, CPG-ODN 1826, Titer Max Gold, QS21+CPG-ODN 1826	Altamente Imunogênica	GENTIL et. al, 2010

Em estudo mais abrangente, FENG et al. (2005) compararam as sequências de aminoácidos do ectodomínio e de cada um dos domínios da *PfAMA-1* separadamente com as sequências correspondentes a outras 8 espécies importantes de *Plasmodium*: *P. reichenowi*, *P. chabaudi*, *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. fragile*, *P. knowlesi*, *P. vivax* e *P. cynomolgi*. Foi observado que as médias de identidade entre as sequências foram de: 57,1% para a proteína inteira, 53,2% para o domínio I, 64,1% para o domínio II e 58% para o domínio III. Ao estenderem esta análise para outros dois parasitos do filo Apicomplexa (*Toxoplasma gondii* e *Babesia bovis*), os autores encontraram 54,1%, 47,7%, 56,5% e 49,4% de identidade, respectivamente. Os autores concluem que o alto grau de conservação da sequência do domínio II é consistente com o papel de manter a estrutura tridimensional de AMA-1 e/ ou manutenção de sua função.

PvAMA-1 tem apenas um haplótipo predominante e, portanto, limitada diversidade genética tem sido demonstrado em várias regiões geográficas (revisto por SOUZA-NEIRAS et al., 2007). Análises de sequências da região polimórfica correspondente aos nucleotídeos 324-735 (aminoácidos 108-245) do gene *PvAMA-1* tem indicado com base em uma substituição de aminoácidos que dois genótipos estão presentes em isolados sul-coreano (HAN et al., 2002; CHUNG et al., 2003). Os isolados contêm variações não-sinônimas em 3 posições diferentes em relação à Cepa Belém. Variação na posição do resíduo de aminoácido 189 (Glu-Lys) foi encontrado apenas em Skor tipo I (ou SKA). Comparação de 219 sequências de coletados de nove países revelou que o polimorfismo de *PvAMA-1* em isolados coreano é semelhante ao de 2 isolados chineses, concluindo-se que esses dois tipos de genótipos são comuns em países do leste asiático (HWANG et al., 2009).

Em estudo pioneiro realizado pelo nosso grupo, RODRIGUES et al. (2005), foi caracterizada a reatividade de anticorpos séricos em indivíduos brasileiros infectados com malária por *P. vivax*, com duas proteínas recombinantes [Pv66/AMA-1 (cepa Salvador) e His₆-AMA-1 (sequencia de AMA-1 amplificada a partir de eritrócitos infectados de um paciente com infecção patente)] representando o ectodomínio de PvAMA-1. Uma alta frequência de indivíduos com infecção patente pelo *P. vivax* reagiu com as duas proteínas. A frequência de resposta foi de 75,7% entre os indivíduos primo infectados e atingiu 100% em indivíduos com três ou mais episódios anteriores de malária. Esta observação sugere que PvAMA-1 é altamente imunogênica em indivíduos expostos a episódios de malária.

Em 2006, WICKRAMARACHCHI et al., realizaram um estudo de coorte transversal, que examinou a resposta de anticorpos contra *P. vivax* durante infecções naturais em populações do Sri Lanka, onde possui áreas endêmicas e não endêmicas para a malária. Amostras de sangue dos pacientes foram coletadas e foi possível observar que a prevalência de anticorpos aumenta com a exposição. Ainda em 2006, MORAIS et al., também verificaram o efeito da intensidade de exposição à malária no desenvolvimento de anticorpos contra PvAMA-1 em indivíduos naturalmente expostos, mas sem infecção patente no momento da coleta de sangue, em áreas distintas dentro da região Amazônica Brasileira. As análises das respostas das subclasses de IgG mostraram a prevalência de IgG1 e IgG3, principalmente em indivíduos com exposição a longo prazo. Os níveis de anticorpos citofílicos foram elevados, sugerindo que a exposição contínua pode causar uma imunidade parcial contra a malária.

Outro trabalho publicado pelo nosso grupo, em 2007, BARBEDO et al., compararam o reconhecimento de anticorpos IgG humanos contra três proteínas

recombinantes da fase eritrocítica assexuada de *P. vivax* (a MSP-1₁₉, AMA-1 e DBP-RII). Os resultados mostraram que a frequência de positividade para *PvAMA-1* e *PvDBP-RII* aumentaram nos indivíduos que tiveram múltiplas infecções, sugerindo que a soroconversão para estas proteínas ocorre após repetidas exposições à malária, confirmando que AMA-1 é imunogênica em infecções naturais.

Em trabalho realizado por MÚFALO et al. (2008), 5 novas proteínas baseadas nos diferentes domínios de *PvAMA-1* foram geradas para mapear as regiões mais imunogênicas desta proteína. Neste estudo foi possível observar que proteínas contendo o DII (DII, DI-II, DII-III) foram altamente reconhecidas por anticorpos IgG de indivíduos infectados de áreas endêmicas de malária.

5. Protocolos de imunizações “Prime Boost”

É bem comum ser necessárias várias doses de uma vacina para que a mesma seja eficaz. Para vacinas pediátricas, até cinco doses podem ser necessária, como é o caso da vacina para difteria, tétano e coqueluche (DTP), que é administrada três vezes durante os primeiros seis meses após o nascimento, seguido de uma quarta dose no segundo ano de vida e ainda um novo impulso entre quatro e seis anos de idade. Mesmo em adultos essa prática é comum já que a vacina para o tétano, também necessita de uma nova dose a cada 10 anos de vida. Embora não seja ainda esclarecido por que algumas vacinas exigem mais imunizações do que outras, esse protocolo de vacinação conhecido como *prime - boost* (prime = indução, boost = reforço) é bem aceito atualmente até mesmo para vacinas de maior sucesso. Este princípio aplica-se a vacinas que se utilizam vírus atenuados (febre amarela), vacinas inativadas (hepatite A), vacinas de subunidades com proteínas

recombinantes (hepatite B) e ainda vacinas com polissacarídeos (*Haemophilus influenzae* tipo b). Nesses casos, o *prime - boost* é homólogo, já que as mesmas vacinas dadas nas imunizações anteriores são usadas para aumentar as imunizações subseqüentes. Durante a última década, diversos estudos mostraram que a vacinação *prime – boost* pode ser administrada com diferentes vetores durante a utilização do mesmo antígeno, o que caracteriza um protocolo de *prime – boost* heterólogo. O achado mais interessante, é que em muitos casos, o *prime – boost* heterólogo é mais eficaz que o homólogo (revisto por LU, 2009).

Em estudo de RODRIGUES et al. (1997), foi utilizado um adenovírus recombinante expressando a proteína CS de *P. yoelli*, e estes resultados mostraram que uma única dose deste vírus recombinante induziu um grande número de células CD4+ e CD8+, além de induzir altos títulos de anticorpos, quando administrado por via subcutânea ou intramuscular.

Já em 2004, KONGKASURIYACHAI et al., desenvolveram um protocolo de imunização utilizando vacinas do estágio sexual do parasito. Assim, construíram vacinas de DNA expressando Pvs25 e Pvs28. Após 3 doses da vacina, foram detectados altos níveis de anticorpos por ELISA. Imunizações realizadas com Pvs25 co-administrada com Pvs28, não alteraram o padrão de resposta de anticorpos específicos, bem como permaneceu eficaz no bloqueio da transmissão do parasito demonstrando uma redução de em 91-99% no número de oocistos no intestino médio do mosquito. Várias combinações de protocolos homólogos e heterólogos foram utilizados para aumentar a eficiência da vacina (DNA/DNA; DNA/Proteína, Proteína/Proteína), demonstrando que estes foram comparáveis quanto a quantidade de anticorpos produzidos, sendo que o menos eficiente foi DNA/DNA.

Adenovírus recombinante também são vetores eficientes para induzir resposta específica, tanto celular como humoral. Protocolos de imunização homólogos utilizando esse vetor para imunização em camundongos demonstraram-se eficazes contra *Leishmania spp* (RESENDE et al., 2008), *Toxoplasma gondii* (CAETANO et al., 2006) e *Trypanossoma cruzi* (MACHADO et al., 2006). Até o presente momento vetores de adenovírus humano tipo 5 (Ad5) demonstraram uma capacidade de gerar respostas imunes em seres humanos, embora tenha sido questionado a possibilidade de uso devido a imunidade pré-existente detectadas em algumas pessoas (SUMIDA et al., 2004).

Em trabalho recente publicado por BOUILLET et al., (2011), foram utilizados dois sistemas para expressar AMA-1 de *P. vivax* (*E. coli* e adenovírus 5). Camundongos imunizados tanto com a proteína recombinante como com o vetor adenoviral, induziram respostas de anticorpos específicos contra o *P. vivax*. Anticorpos gerados por essas imunizações foram capazes de reagir fortemente com merozoítos livres. Ainda realizaram a comparação de respostas imune humoral e celular induzida através de diferentes protocolos homólogos e heterólogos de imunização. Uma única imunização com a proteína recombinante emulsificada em Montanide ISA720 ou com o adenovírus recombinante induziu anticorpos IgG facilmente detectáveis, sendo que os títulos de anticorpos foram mais altos quando se utilizava PvAMA-1 em Montanide ISA 720. Quando a eficiência dos diferentes protocolos de indução e reforço foram comparados, os resultados demonstraram que as imunizações realizadas com Proteína/Proteína e Proteína/Adenovírus foram os mais eficientes.

6. Adjuvantes

Os adjuvantes podem agir diretamente no sistema imune aumentando a resposta aos antígenos, como por exemplo, os ligantes de TLR, citocinas, saponinas e exotoxina de bactérias que estimulam a resposta imune; ou ainda podem facilitar a apresentação de 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, nesse caso, representado por sais minerais, emulsões, lipossomos, virossomos, microesferas de polímeros biodegradáveis e complexos imune-estimulantes (ex. ISCOM, ISCOMATRIX™) (revisto por REED et al., 2009). A Tabela 3 apresenta a resposta imune induzida por adjuvantes.

As vacinas tradicionais, baseadas em patógenos atenuados não exigem a adição de adjuvantes, pois são suficientemente imunogênicas. Por outro lado, vacinas baseadas em proteínas, embora ofereçam uma considerável vantagem quanto à segurança e ao custo de produção, possuem uma imunogenicidade limitada necessitando assim, de adjuvantes para induzir uma resposta protetora e duradoura. Apesar de existirem vacinas recombinantes baseadas em proteínas, como a vacina da Hepatite B, formulada com sucesso apenas utilizando sais de alumínio (Alum) como adjuvante, a próxima geração de vacinas recombinantes para doenças como a malária, tuberculose e HIV, terá que ter não só uma resposta muito forte de anticorpos, mas também uma resposta de células T CD4 e CD8. O Alum será insuficiente para provocar toda essa imunidade, pois é um indutor muito fraco de resposta de células T (revisto por REED et al., 2009).

Até o momento, poucos são os adjuvantes licenciados para uso em humanos. Dentre os adjuvantes licenciados podemos citar sais minerais baseados em

alumínio, o MF59, virossomos e MPL[®] (glicolípídeo). Avanços na área da genômica e proteômica têm acelerado a identificação de novas moléculas para vacinas e com isso a necessidade de melhorar os adjuvantes e suas formulações. Em conjunto com esses avanços, descobertas recentes de como são ativadas as respostas imunológicas têm colaborado para a pesquisa e desenvolvimento desses adjuvantes (revisto por REED et al., 2009).

6.1. Adjuvante Completo e Incompleto de Freund

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. Em um estudo inicial para avaliar a eficácia do AIF em vacina para a gripe, foi demonstrado que este induziu altos níveis de anticorpos, que persistiram quando comparados com os indivíduos que receberam somente a vacina sem adjuvante. Outro ensaio clínico, para cólera, também utilizou este adjuvante, mostrando uma proteção mais duradoura. Em um levantamento realizado pela WHO mostrou que imunizações realizadas em aproximadamente um milhão de pessoas com AIF, 40 apresentaram efeitos adversos locais mais graves, como abscessos estéreis (revisto por MILLER et al., 2005).

6.2. Hidróxido de Alumínio

Os adjuvantes à base de alumínio, genericamente chamados de Alum, são componentes de diversas vacinas licenciadas para humanos, incluindo difteria, tétano, coqueluche, hepatite A e B, influenza, poliomelite, e HPV. As vantagens

desse adjuvante incluem seus registros de segurança, aumento na resposta imunológica (títulos de anticorpos mais rápido e resposta duradoura), estabilização do antígeno e formulação relativamente simples para produção em larga escala. As principais limitações dos adjuvantes de alumínio é a sua incapacidade de obter uma resposta celular do tipo Th1, que são necessárias para patógenos intracelulares, tais como os que causam a malária (revisto por REED et al., 2009).

Este adjuvante atua através da formação de um depósito que induz a liberação gradual do antígeno adsorvido no local da injeção. Este processo pode permitir a exposição mais prolongada do antígeno ao sistema imunológico, aumentando assim a probabilidade de ocorrer a interação entre as células apresentadoras de antígenos (APC) e antígeno. GOTO et al. (1993) mostraram que este adjuvante induz a um aumento da permeabilidade vascular associado ao efeito tóxico sobre os macrófagos. Outro mecanismo sugerido é que este adjuvante ativa a cascata do complemento e gera um ambiente inflamatório no local da injeção caracterizado pelo recrutamento de células sanguíneas (revisto por TRITTO et al., 2009).

O Alum induz predominantemente resposta imune do tipo Th2, associada à produção de interleucina IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e anticorpos IgG1, IgE e IgA (MOSMANN et al., 1989). Este predomínio de resposta Th2 deve ser responsável pelas observações que o Hidróxido de Alumínio atrai eosinófilos para o local de inoculação da vacina, e estimula a produção de anticorpos IgE. Devido a isto tem sido sugerido que a utilização periódica de vacinas associadas a componentes de alumínio pode estar relacionada ao aumento da incidência de doenças alérgicas (COGNE et al., 1985).

6.3. Quil A

O Quil A é extraído da casca da árvore *Quillaja saponaria*. É composto por glicosídeos triterpenóides que variam em sua ação adjuvante e toxicidade veterinárias (revisto por REED et al., 2009). Uma fração purificada do Quil A, o QS-21 têm sido amplamente utilizado em vacinas vaterinárias e atualmente está sendo testado em estudos em humanos (revisto por COFFMAN et al.,2010).

6.4. MPLA

O MPLA (Monophosphoryl Lipid A) comumente utilizado é derivado de LPS de *Salmonella Minnesota*, uma bactéria gram negativa, e, portanto é classificado como um PAMP.

A remoção de um resíduo de fosfato do LPS resulta no MPLA, diminuindo assim, sua toxicidade. O MPLA atua como um agonista de TLR4 em APCs, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias. Em vários estudos pré-clínicos o MPLA mostrou ser capaz de induzir a síntese de citocinas do tipo 1 (IL-2, IFN- γ) que promovem a geração de respostas do tipo Th1.

Clinicamente o MPLA tem sido frequentemente utilizado em formulações complexas, incluindo lipossomas e emulsões, e também tem sido utilizado em Em 2009, QUINTILIO et al., caracterizaram a resposta adjuvante de MPLA derivado de *Bordetella pertussis*, em um esforço para desenvolver uma vacina contra a gripe sazonal com menor reatogenicidade e preços acessíveis. Os testes relataram que concentrações baixas de MPLA de *B. pertussis*, adsorvida ou não em Al(OH)₃ é

eficiente para induzir altos títulos de inibição de hemaglutinação em camundongos, mesmo com uma redução de 4 vezes na dose da vacina.

Tabela 3 - Resposta imune induzida por adjuvantes (Tabela adaptada da revisão de COFFMAN et al., 2010).

Adjuvante	Principal Componente Imunoestimulatório	Receptores Inatos ou Rota de ativação	Principal resposta imune estimulada
Adjuvantes Licenciados			
Alum	Sais de Alumínio	NLRP3 inflamassomo	Ac, Th2 (+ Th1 em humanos)
MF59 e AS03	Emulsão de esqualeno em água	Inflamação do tecido (Não há receptores definidos)	Ac, Th1 + Th2
AS04	MPL + Alum	TLR4 e inflamassomo	Ac, Th1
Adjuvantes de amplo uso experimental ou em fase final de desenvolvimento clínico			
Poly – IC	Derivados sintéticos de dsRNA	TLR3, MDA5	Ac, Th1, células T CD8+
MPL e formulações (AS01 e AS02)	MPL e QS-21	TLR4 (MPL), (QS-21)	Ac, Th1
Flagelina	Flagelina de <i>S. typhimurium</i>	TLR5	Ac, Th1 + Th2
CpG oligodeoxinucleotídeos e formulações (IC31, QB10)	oligonucleotídeos de DNA sintéticos ligados a fosforotiolato com motivos CpG otimizados	TLR9	Ac, Th1, T CD8+ (quando conjugado)
ISCOMS e ISCOMATRIZ	Saponinas	Mecanismo não definido	Ac, Th1 + Th2, T CD8+
AIF (Formulações com Montanide)	Mineral ou parafina do petróleo + surfactante	Mecanismo não definido	Ac, Th1 + Th2
CFA	IFA + peptídeoglicanos, dimicolato de trealose	NLR, inflamação, Macrófagos induzidos po lectina tipo C, TLR	Ac, Th1, Th17

* Ac (anticorpos)

Recentemente, MIYAKI et al. (2010), desenvolveram condições para a produção de vacinas contra a gripe H5N1 com formulações contendo Al(OH)₃ e MPLA. Os dados mostraram que animais imunizados com a vacina de vírus inteiro inativado de H5N1 na presença destes dois adjuvantes em uma emulsão de esqualeno induzia títulos altos de hemaglutinação. Mesmo apresentando pequenos aumentos na imunogenicidade do vírus H5N1, esse valor poderia ter um impacto crucial em um cenário de pandemia, especialmente para uma população que nunca foi exposta a este vírus. Essa combinação mostrou que é possível reduzir a quantidade de antígeno por dose de vacina e que ainda é necessário uma investigação mais detalhada em voluntários humanos para determinar a dose mínima segura para avaliar o impacto do uso desses adjuvantes.

6.5. Flagelina (*Salmonella Typhimurium*) – (FliC)

Flagelos representam um dispositivo de locomoção complexo expresso em diferentes bactérias. Eles podem abranger pelo menos 50 proteínas diferentes. Também podem comportar-se como fatores associados à virulência, ajudando patógenos a se ligar às células epiteliais e superar mecanismos de defesa. O flagelo da *Salmonella Typhimurium* é composta por aproximadamente 20.000 subunidades de uma proteína chamada flagelina (FliC) e esta possui massa molecular que pode variar de 28 kDa a 80 kDa (RAMOS et. al., 2004).

As propriedades adjuvantes da flagelina ajudam a aumentar a resposta imune para uma variedade de antígenos, onde respostas protetoras dependentes de anticorpos foram obtidas contra uma variedade de patógenos, (APPLEQUIST et al., 2005). Além disso, a observação de que a flagelina é um agonista de TLR5 abriu a

possibilidade de que células eucarióticas podem ser capazes de produzir essa molécula (HAYASHI et al., 2001). A flagelina é ainda reconhecida por um complexo de receptores IPAF/Naip5 pertencente à família de receptores do tipo NOD “NOD-like receptors” (MIAO et al., 2007; LIGHTFIELD et al., 2008). Esses receptores formam complexos chamados inflamassomas e, ao contrário do TLR5 que responde à flagelina extracelular, IPAF/Naip5 responde a flagelina localizada no citoplasma das células (MIAO et al., 2007).

Foi ainda descrito por HULLEAT et al. (2008) que a flagelina reconhece receptores imune inatos ativando respostas inata e adaptativa, o que intensificou os estudos em flagelos bacterianos como adjuvantes para vacinas. Diferentes sistemas que utilizam a flagelina como adjuvantes para proteínas recombinantes de fusão ou co-administração com antígenos foram testados nos últimos anos para uma compilação detalhada e atualização desses dados (revisto por BARGIERI et al., 2011).

Os mecanismos pelos quais a flagelina atua como um adjuvante ainda não é totalmente compreendido, mas é provável que seja dependente de células apresentadoras de antígenos, especialmente de células dendríticas, para melhorar a apresentação do antígeno (revisto por BARGIERI et al., 2011).

II. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar a imunogenicidade do Antígeno 1 de Membrana Apical de *Plasmodium vivax* (PvAMA-1), quando administrado em camundongos, utilizando protocolos homólogos e heterólogos de indução e reforço com DNA plasmidial e/ou proteína recombinante.

2. Objetivos Específicos

- 2.1 Gerar os plasmídios recombinantes correspondentes ao ectodomínio de PvAMA-1 para expressão em células eucarióticas de mamíferos e na levedura *Pichia pastoris*;
- 2.2 Expressar e purificar a proteína recombinante PvAMA-1 a partir de *Pichia pastoris*;
- 2.3 Avaliar o efeito da administração do antígeno PvAMA-1 em camundongos utilizando protocolos homólogos e heterólogos de indução e reforço com DNA e/ou proteína recombinante;
- 2.4 Avaliar comparativamente a resposta imune humoral (anticorpos IgG e subclasses de IgG) e celular (linfoproliferação e detecção de citocinas) induzida em camundongos após imunização com a proteína PvAMA-1 na presença de diferentes adjuvantes;
- 2.5 Verificar se soros policlonais anti-PvAMA-1 são capazes de reconhecer a proteína nativa expressa em merozoítos de isolados naturais 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 proteína (SDS-PAGE).

Gel de empilhamento: 3% de acrilamida/bisacrilamida, a partir das soluções estoque (12% (m/v) acrilamida (Invitrogen), 1,2% (m/v) bis-acrilamida (Invitrogen) e 0,25 mM Tris (Invitrogen), 0,2% (m/v) dodecilsulfato de sódio (SDS – Invitrogen) e polimerizados utilizando-se 0,1% (m/v) de persulfato de amônio (Sigma) e 12 µL de TEMED (Invitrogen) para 5 mL de solução final.

Gel de separação: 12% ou 15% de acrilamida/bisacrilamida, a partir de soluções estoque (30% (m/v) acrilamida, 0,8% (m/v) bis-acrilamida e 0,75 mM Tris, 0,2% (m/v) SDS) e polimerizados utilizando-se 0,1% (m/v) de persulfato de amônio e 12 µL de TEMED (Invitrogen) para 9 mL de solução final.

Tampão de amostra para SDS-PAGE (4x): concentração final: 2,5% (m/v) glicerol (Synth), 4% (m/v) SDS, 25 mM 2-mercaptoetanol (Bio-rad), 12,5 mM Tris-HCl e 0,025 mM azul de bromofenol (Bio-rad).

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

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

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

1.2. Meios para cultura de bactérias.

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

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

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

1.3. Meios para cultura de *Pichia pastoris* e soluções estoque.

YPD (Yeast Extract Peptone Medium): 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose (glucose).

BMGY (Buffered Glycerol – Complex Medium): 1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 100 mM KH_2PO_4 , 0,34% (m/v) base nitrogenada de levedura (YNB), 1% (m/v) sulfato de amônio, $4 \times 10^{-5}\%$ (m/v) biotina e 3% (m/v) glicerol (Sigma).

BMMY (Buffered Methanol – Complex Medium): 1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 100 mM KH_2PO_4 , 0,34% (m/v) base nitrogenada de levedura, 1% (m/v) sulfato de amônio, $4 \times 10^{-5}\%$ (m/v) biotina e 0,5% (v/v) metanol.

1.4. Tampões utilizados para a purificação da proteína AMA-1 a partir do sobrenadante da expressão em *Pichia pastoris*.

Tampão de equilíbrio: 20 mM NaH_2PO_4 , 20 mM Na_2HPO_4 , 200 mM NaCl, pH=8,0.

Tampão de lavagem: 20 mM NaH_2PO_4 , 20 mM Na_2HPO_4 , 0,5 M NaCl pH 8,0, 10% glicerol (m/v) e 1 mM PMSF; pH=6,0.

1.5 Soluções e tampões para “immunoblotting”.

Tampão de transferência: 160 mM glicina, 25 mM Tris e 20% (v/v) metanol.

Ponceau-S: 0,1% Ponceau red; 10% ácido acético.

Solução de bloqueio: PBS; 5% (m/v) leite em pó, 2,5% (m/v) albumina sérica bovina (BSA-Sigma).

Solução de revelação: kit ECL Western Blotting Analyses System (GE Healthcare).

1.6 Soluções e tampões para ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

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

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

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

Tampão fosfato-citrato: 0,2 M Na_2HPO_4 (Synth), pH final 4,5-5,0 ajustado com 0,2 M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (Synth).

Solução de bloqueio:

Para ensaios com soros de camundongos: PBS; 5% (m/v) leite em pó desnatado (Molico[®]), 2,5% (m/v) albumina sérica bovina (BSA-Sigma).

Para ensaios com soros humanos: PBS, 5% (m/v) de leite em pó desnatado (Molico[®]).

Solução para diluição de amostra

Para ensaios de detecção de anticorpos com soros de camundongos: PBS, 5% (m/v) leite em pó desnatado (Molico[®]), 2,5% (m/v) albumina sérica bovina (BSA-Sigma).

Para ensaios de detecção de anticorpos com soros humanos: PBS, 5% (m/v) de leite em pó desnatado (Molico[®]).

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 milli Q autoclavada.

1.7 Meios e Soluções utilizados para a cultura de células esplênicas.

Meio RPMI: 1,04% (m/v) RPMI 1640 (Sigma); 0,2% (m/v) bicarbonato de sódio; 0,24% (m/v) HEPES; 133 μ g/mL estreptomicina; 59 μ g/mL penicilina.

Tampão hemolítico: 0,15M NH_4Cl , 2,4mM $NaHCO_3$ e 0,1 mM EDTA.

Meio RPMI completo: Meio suplementado com 2 mM L-glutamina (Gibco), 10 mM Hepes (Serva), 0,2% (m/v) de bicarbonato de sódio, 1% (m/v) de aminoácidos não essenciais (Gibco), , 1 mM de piruvato de sódio (Gibco), 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol (Gibco), 10% (v/v) de soro bovino fetal (Gibco).

2. Geração dos plasmídios recombinantes contendo o gene *ama-1* de *P. vivax*.

2.1. Geração do plasmídio para expressão em células de mamíferos.

A sequência de nucleotídeos correspondente ao ectodomínio de *ama-1* de *P. vivax* (*Pvama-1*) foi obtida através da amplificação por PCR a partir do plasmídio recombinante pMOS-*Pvama-1* (RODRIGUES et al., 2005), o qual contém o gene que codifica os aminoácidos 43 a 487, correspondentes aos domínios I a III (ectodomínio) de AMA-1. As reações de PCR foram realizadas com os seguintes oligonucleotídeos (Invitrogen): senso (5' - GGA GGT ACC CCT ACC GTT GAG AGA AGC – 3') e anti senso (5' – AGT GGA TCC TAG TAG CAT CTG CTT GTT CGA –

3'). As porções sublinhadas dos oligonucleotídeos senso e anti-senso indicam sítios de restrição para as enzimas *KpnI* e *BamHI*, respectivamente.

Após a amplificação do gene *Pvama-1*, os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o kit Geneclean II (Q-BIOgene). Os insertos purificados foram ligados inicialmente no vetor comercial pGEM-T-Easy, de acordo com as instruções do fabricante (Promega), para a análise da sequência de DNA. Os clones recombinantes foram selecionados por análise de restrição enzimática das preparações de plasmídios obtidas em pequena escala. Todas as construções selecionadas foram analisadas por seqüenciamento do DNA no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo.

Posteriormente, os insertos foram removidos do vetor pGEM-T-Easy através de digestão com as enzimas apropriadas e foram subclonados no vetor de expressão eucariótica pcDNA3 (Invitrogen) modificado (pIgSP), o qual contém um peptídeo sinal (SP) e um forte promotor de citomegalovírus (CMV) (BOSCARDIN et al., 2003). A Figura 4 apresenta uma representação esquemática do gene *Pvama-1* inserido no vetor pIgSP.

Após seleção de um clone, utilizamos o kit Plasmid Giga Kit (QIAGEN), para purificação do DNA de acordo com as instruções do fabricante.

Figura 4. Representação esquemática do plasmídeo recombinante pIgSP-*Pvama-1*.

2. 2. Geração do plasmídio para expressão da proteína recombinante em *Pichia pastoris*.

O plasmídio recombinante correspondente aos aminoácidos 43 a 487 de AMA-1 de *P. vivax* foi sintetizado comercialmente (Genscript, EUA) com o intuito de otimizar do códon para expressão em *Pichia pastoris*, além de remover 3 sítios de glicosilação no gene *Pvama-1*. O gene sintético, inicialmente presente no vetor PUC57 foi obtido através da digestão com a enzima de restrição *NotI* (Invitrogen). O fragmento correspondente foi inserido no vetor de expressão pPIC9K (Invitrogen) digerido com a mesma enzima de restrição, o qual contém um peptídeo sinal (α -factor) para expressão secretada em *Pichia pastoris* (Figura 5). Após transformação em bactérias DH5 α , as colônias contendo plasmídios com insertos na orientação correta foram selecionadas por análise de restrição enzimática. Todas as construções selecionadas foram analisadas por seqüenciamento do DNA utilizando os oligonucleotídeos α -factor (senso) e 3'AOX1 (anit-senso) no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo.

Figura 5. Representação esquemática da fase de leitura aberta da seqüência presente no vetor pPIC9K para expressão em *Pichia pastoris*.

3. Preparo do plasmídio pPIC9K-ama-1 para integração na levedura *Pichia pastoris*.

3.1. Preparação de bactérias competentes.

Para o preparo de bactérias competentes uma colônia de DH5 α (Invitrogen) foi inoculada em 3 mL de meio LB sem antibiótico e mantida em incubadora, durante a noite, a 37°C, a 200 rpm. Posteriormente, 1 mL dessa cultura foi inoculada em 35 mL de LB sem antibiótico e mantida sob as mesmas condições de crescimento até atingir a atingir DO_{550nm} entre 0,35 e 0,6. Após o período de crescimento a cultura foi mantida no gelo por 60 minutos. As células foram centrifugadas por 15 minutos, 4°C, a 2.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 10 mL de FB, pH 6,2 (KCl 100 mM, 50 mM CaCl₂.2H₂O, Glicerol 10% (m/v), acetato de potássio 10 mM). Nova incubação foi realizada em gelo por mais 60 minutos e após esse período as células foram então centrifugadas por 15 minutos, 4°C, a 2.000 rpm. O sedimento foi ressuspendido em 2,4 mL de FB e alíquotas de 100 μ L foram realizadas em tubos de microcentrífuga estéreis e congeladas a -80°C até o momento de uso.

3.2. Transformação de bactérias *E. coli*

Uma alíquota da bactéria competente foi retirada do freezer e descongelada dentro do gelo. Após o descongelamento completo adicionou-se aproximadamente 50 ng do plasmídio. O tubo de microcentrífuga foi então colocado novamente no gelo, e incubado por 30 minutos. Após esse período, foi efetuado então o choque térmico, onde o tubo de microcentrífuga contendo o material foi colocado no banho

úmido a 42°C por 2 minutos e depois mais 5 minutos no gelo. Após esse período, adicionou-se o meio SOC (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 0,02 M de glicose e 0,01 M MgCl₂), e colocou-se na incubadora, durante 1 hora, 37°C, a 200 rpm. Após esse período, plaqueou-se em meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL), e a placa foi mantida na estufa a 37°C, durante a noite.

3.3. Obtenção de DNA plasmidial através de Lise Alcalina.

Uma colônia contendo o plasmídio de interesse (pPIC9K-*ama-1*) foi inoculada em 70 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL). O material ficou em crescimento, por 16 horas, a 37°C, a 200 rpm. As células foram então centrifugadas por 10 minutos, 4°C, a 5.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi então ressuspensionado em 3 mL da solução A (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM), que atua como um tampão para a lise. Após, acrescentou-se 6 mL da solução B (NaOH 0,2 M e SDS 1% (m/v)). Esta solução atua desnaturando as proteínas e o DNA e inicia-se a hidrólise do RNA. Incubou-se no gelo por 10 minutos. Após incubação foi adicionado 4,5 mL da solução C (acetato de potássio 3 M e ácido acético 5 M), que é uma solução de neutralização, e misturou-se suavemente. Incubou-se no gelo por 15 minutos. Após esse período o tubo foi centrifugado por 10 minutos, 4°C, a 8.000 rpm. O material obtido foi então filtrado em gaze e dois volumes de etanol absoluto, a T.A. foram adicionados, e o tubo foi incubado novamente no gelo por 10 minutos. Após esse período, centrifugou-se o material novamente por 10 minutos, 4°C, a 8.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido permaneceu sob T.A. até secagem. Após secagem, o sedimento foi ressuspensionado em 200 µL TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1

mM, pH 7,6). Nessa solução adicionou-se ainda 2 μ L de NaCl 5 M e 10 μ L de RNase (10 mg/mL) e incubou-se a 37°C por 30 minutos. Após o período de incubação, adicionou-se 4 μ L de SDS 10% e 2 μ L de Proteinase K (10 mg/mL) e nova incubação foi realizada a 37°C por 30 minutos. Posteriormente foi adicionado fenol-clorofórmio (1:1), o tubo foi passado no vórtex e centrifugou-se por 3 minutos, T.A., a 13.000 rpm. A segunda fase, a menos densa, foi retirada e a essa parte adicionou-se clorofórmio (1:1). O tubo foi passado novamente no vórtex e centrifugado por 3 minutos, T.A., a 13.000 rpm. Novamente retirou-se a 2ª fase e a esta adicionou-se 100 μ L de acetato de amônio 7,5 M. Misturou-se bem. Adicionou-se também 600 μ L de etanol absoluto gelado e o material foi incubado a -20°C por 30 minutos. Centrifugou-se por 15 minutos, 4°C, a 12.500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi acrescentado 500 μ L de etanol 70%. Centrifugou-se novamente por 5 minutos, 4°C, a 12.500 rpm. Após secagem a T.A., o sedimento ressuspenso em 40 μ L de TE.

3.4. Linearização dos plasmídios.

Para a transformação em *Pichia pastoris* linhagem GS115 competente (Invitrogen), 30 μ g do plasmídio pPIC9K-*ama-1* foi linearizado com as enzimas de restrição *Bgl*II ou *Sal*I de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). Após período de digestão, realizou-se a precipitação do DNA. Para isso, foi adicionado 2 volumes de etanol absoluto gelado e o material ficou por 16 horas, a -20°C. Após o término de incubação centrifugou-se por 15 minutos, 4°C, a 12.000 rpm. O sedimento foi lavado com 500 μ L de etanol 70% gelado e novamente centrifugado

nas mesmas condições. Após secagem do sedimento a T.A., este foi ressuspenso em TE.

3.5. Preparação das leveduras competentes.

Uma colônia de levedura foi inoculada em 5 mL de meio YPD em um erlenmeyer de 125 mL, o qual foi então incubado por 16 horas, 30°C, 200 rpm. A seguir, 0,3 mL deste pré-inóculo foi inoculado em 500 mL de meio YPD em um erlenmeyer de 2 litros. A cultura foi incubada novamente, nas mesmas condições acima, até atingir uma densidade óptica a 600 nm de 1,3 a 1,5. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 4°C, 1.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento solubilizado em 250 mL de água gelada estéril. Uma nova centrifugação, nas mesmas condições, foi realizada e o sedimento foi solubilizado em 125 mL de água gelada estéril. Após outra etapa de centrifugação por 10 minutos, a 4°C, 1.500 rpm, o sedimento foi solubilizado em 20 mL de sorbitol (Sigma) 1 M estéril e gelado. Ao final da última centrifugação, o sedimento foi solubilizado em 200 µL de sorbitol 1 M estéril e gelado.

3.6. Transformação por eletroporação.

Para a transformação, 80 µL de células competentes foram misturados com 10 µg de DNA linearizado com a enzima de restrição *Bgl*II ou *Sal*I. As células foram transferidas para uma cubeta de 0,1 cm (BioRad) gelada e incubadas no gelo por 5 minutos. As mesmas foram eletroporadas no eletroporador BTX® modelo ECM 830 nas seguintes condições: Modo LV, a 270 v e comprimento do pulso de 11 ms. Após o choque, adicionou-se imediatamente 1 mL de sorbitol 1 M gelado e as células

transformadas foram transferidas para microtubos estéril. As células foram semeadas em meio mínimo contendo glicose 2%, sem histidina (MD). As leveduras transformantes *His+* foram identificadas após 2-3 dias de incubação a 30°C.

4. Estabelecimentos das condições de expressão e purificação da proteína recombinante a partir de *Pichia pastoris*.

4.1. Seleção dos clones e análise da expressão protéica em pequena escala.

A seleção dos clones para expressão foi feita por avaliação da resistência ao antibiótico geneticina (G418, Sigma) nas concentrações finais de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL em meio YPD. Para os experimentos de expressão em pequena escala os clones transformantes foram cultivados durante 24 horas, a 30°C, 200 rpm, em 10 mL de meio contendo glicerol 1% (BMGY). Após este período, as células foram recolhidas por centrifugação durante 10 minutos, T.A., a 1.500 rpm. Em seguida, foram ressuspensas em 2 mL de meio contendo 0,5% de metanol (BMMY) e cultivadas por um período adicional de 4 dias. A indução foi mantida pela adição diária de metanol na concentração final de 1%. Alíquotas de cultura foram coletadas após 24, 48, 72 e 96 horas e a presença de proteína no sobrenadante foi analisada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15%. O clone que apresentou uma melhor expressão em pequena escala foi utilizado para a expressão em média escala para purificação da proteína.

4.2. Expressão da proteína PvAMA-1 em média escala.

Para os experimentos de expressão em média escala o clone selecionado foi cultivado durante 24 horas, 30°C, 200 rpm, em 200 mL de meio contendo glicerol 1% (BMGY). Após este período, as células foram recolhidas por centrifugação, durante 10 minutos, T.A., a 1.500 rpm e solubilizadas em 2 litros de meio contendo 1% de metanol (BMMY) e cultivadas por um período adicional de 4 dias. A indução foi mantida pela adição diária de metanol na concentração final de 1%. Após esse período, a presença de proteína no sobrenadante foi analisada em SDS-PAGE a 15%. O sobrenadante contendo a proteína solubilizada foi concentrado 10X utilizando-se um dispositivo de ultrafiltração amicon (Milipore), de acordo com as instruções do fabricante e dialisado em membrana para diálise (SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing 10.000 MWCO, Thermo Scientific) contra o tampão de equilíbrio durante 30 horas. O sobrenadante foi aplicado lentamente em resina de níquel (Ni Sepharose high performance - GE Healthcare) previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio. Em seguida a resina foi lavada com o tampão de lavagem e submetida a um gradiente de imidazol (USB) (15 a 400 mM) em tampão de lavagem.

Após passagem pela resina, as alíquotas foram recuperadas e analisadas por SDS-PAGE 15%. As frações contendo a proteína foram reunidas e dialisadas em membrana para diálise (SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing 10.000 MWCO, Thermo Scientific) contra 20 mM Tris-HCl pH 8.0. Após a diálise, a proteína foi filtrada (0,45 µm) e purificada por cromatografia de troca iônica, utilizando a Coluna Q FF (GE), previamente equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 8,0, que estava acoplada ao sistema ÄKTA prime plus (GE). A eluição da proteína ocorreu com um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl, neste mesmo tampão. As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE, e as que continham a proteína foram dialisadas em

membrana para diálise (SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing 10.000MWCO, Thermo Scientific) contra PBS, durante a noite, sob constante agitação, a 4°C. A concentração de todas as proteínas utilizadas neste estudo foi determinada pelo método de Bradford utilizando o reagente Protein Assay – Dye Reagent Concentrate (BioRad).

5. População de estudo

Um total de 233 amostras de sangue foi incluído neste estudo. Amostras de soro de 208 indivíduos infectados pelo *P. vivax* procedentes de diferentes localidades do Estado do Pará foram utilizadas nos ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-AMA-1. Estas amostras já estavam disponíveis e foram utilizadas em estudos anteriores sobre a resposta imune humana a AMA-1 (RODRIGUES et al., 2003, 2005, MÚFALO et al., 2008).

Vinte e cinco amostras de sangue de indivíduos adultos saudáveis sem história clínica de malária estavam disponíveis para este estudo com o objetivo de estabelecer o “cutoff” para cada proteína recombinante por ELISA. Estas amostras foram utilizadas em estudos anteriores sobre a resposta imune humana a AMA-1 (RODRIGUES et al., 2003, 2005, MÚFALO et al., 2008).

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da FCF/ USP em 15/05/2001.

6. Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-*PvAMA-1*

6.1. Detecção da proteína recombinante AMA-1 por “immunoblotting”.

Após a separação eletroforética, as proteínas recombinantes foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond N, Amersham Biosciences) a uma voltagem de 100 V por 60 minutos usando equipamento “Mini Trans-Blot” (Bio-Rad). A eficiência da transferência foi feita pela coloração da membrana com Ponceau-S. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi incubada por aproximadamente 16 horas a 4°C, em solução de bloqueio. Após este período, a membrana foi incubada por 1 hora, a T.A., com o anticorpo monoclonal anti-His (Amersham Biosciences), diluído em solução de bloqueio (1:1.000) ou ainda contra um painel de anticorpos monoclonais anti-*PvAMA-1* (DII) (1:500) (GENTIL et al., 2010). Após três lavagens de 10 minutos com PBS/ Tween 20 a 0,05%, foi realizada uma incubação por 1 hora a T.A., com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:2.000). Após três lavagens de 10 minutos a revelação foi realizada por quimioluminescência utilizando kit ECL Western Blotting Analyses System (Amersham Biosciences).

6.2. ELISA para detecção de anticorpos anti-*PvAMA-1* em soros de indivíduos com infecção patente por *P. vivax*.

A detecção de anticorpos IgG anti-*PvAMA-1* em soros de indivíduos com infecção patente por *P. vivax* foi realizada por ELISA conforme descrito por RODRIGUES et al. (2005). A concentração de cada proteína recombinante foi ajustada para 2 µg/mL (AMA-1 produzida em *Pichia pastoris*) e 4 µg/mL (AMA-1

produzida em *E. coli*) em tampão contendo 160 mM glicina, 25 mM Trizma base e 20% metanol de acordo com o reconhecimento pelo anticorpo monoclonal anti-His.

Placas de 96 poços ("high binding", Costar 3590) foram sensibilizadas com as proteínas recombinantes em tampão carbonato e incubada durante 16 horas, a T.A. Após esse período, as placas foram lavadas 5 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 (1:100) em solução de bloqueio, em duplicata, e uma nova incubação foi realizada por mais 2 horas, T.A. 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 humano, KPL) diluído em solução de bloqueio. Em seguida, outra incubação foi realizada por 1 hora à T.A. com posterior lavagem com PBS-Tween por 5 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 H₂SO₄ 4N. Títulos específicos anti-AMA-1 foram definidos como a maior diluição com uma DO₄₉₂ superior a 0,1 determinada em um leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA). Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos em log₁₀ ± erro padrão da média (SEM).

6.3. Ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-PvAMA-1 em camundongos imunizados.

A detecção de anticorpos IgG anti-PvAMA-1 em camundongos imunizados foi feita por ELISA conforme descrito anteriormente por GENTIL et al. (2010). Placas de 96 poços ("high binding", Costar 3590) foram sensibilizadas com 2 µg/mL da

proteína homóloga em tampão carbonato e incubada durante a noite, T.A. Após esse período, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween e, em seguida, foi adicionado 200 μ L/poço da solução de bloqueio.

Após incubação a 37°C por 2 horas, foi adicionado 50 μ L/poço de cada um dos soros diluídos a partir de 1:100 em solução de bloqueio e uma nova incubação foi realizada por mais 1 hora à T.A. Após nova etapa de lavagem das placas com PBS-Tween, foram adicionados 50 μ L/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 T.A. com posterior lavagem com PBS-Tween por 3 vezes. A revelação foi feita pela adição de 100 μ L/poço da solução de revelação. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μ L/poço de uma solução contendo H₂SO₄ 4N. Títulos específicos anti-AMA-1 foram definidos como a maior diluição com uma DO₄₉₂ superior a 0,1 determinada em um leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA). A detecção de anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM anti-AMA-1 em camundongos imunizados foi realizada como descrito acima, exceto que o anticorpo secundário foi substituído por anticorpos isotipo-específicos de camundongo (anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM) conjugados a peroxidase (Southern Technologies) em uma diluição de 1:8.000. O título individual foi determinado como sendo a maior diluição do soro que apresentava DO₄₉₂ maior do que 0,1. Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos em $\log_{10} \pm$ erro padrão da média (SEM).

7. 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, 4) Quil A - Saponina de *Quillaja saponaria* (Superfos Biosector, Vedbaek, Denmark), 5) Monophosphoryl Lipid A de *Bordetella pertussis* – MPLA, 6) Flagelina - FliC (*Salmonella typhimurium*). Os adjuvantes Alum e MPLA foram cedidos, respectivamente, pelos pesquisadores Paulo Lee Ho e Isaias Raw, ambos do Instituto Butantan e a Flagelina foi cedida 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 (1:1), Alum (100 µg/dose), Quil A (25 µg/dose), MPLA (5 µg/dose), FliC (5 ou 10 µg/dose). O adjuvante Alum, após a preparação da emulsão, permaneceu sob agitação por aproximadamente 2 horas antes da imunização.

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

8. Imunizações experimentais.

Grupos de 6 camundongos isogênicos BALB/c procedentes do Biotério do IQ - FCF/USP foram usados para os experimentos de imunização com DNA plasmidial e/ou proteína recombinante. Cada animal recebeu 4 doses, sendo cada uma de 100 µg (DNA) ou 10 µg (proteína), num volume final de 0,1 mL com intervalo de 20 dias. A imunização com DNA plasmidial foi realizada por via intramuscular no músculo *Tibialis anterioris*, com auxílio de seringas de insulina U-100 e uma agulha de calibre

27G (DNA). Os animais que receberam a indução com DNA foram tratados com 7 µg de cardiotoxina (Sigma) cinco dias antes (COSTA et al., 1998).

A imunização foi feita por via subcutânea (s.c.) nas duas patas traseiras (1ª dose) ou base da cauda (doses subsequentes), com a proteína emulsificada em ACF ou AIF. Os animais do grupo controle foram imunizados somente com o vetor plgSP vazio (ctr) ou ACF/AIF, dissolvidos em PBS. O esquema de imunização utilizado encontra-se na Tabela 4.

Posteriormente, novas imunizações foram realizadas utilizando-se a combinação de dois antígenos de *P. vivax*, AMA-1 e FliC-MSP1₁₉-PADRE. Para isso, grupos de camundongos isogênicos C57BL/6 procedentes do Biotério da FCF-IQ/USP foram usados para os experimentos de imunização. Cada animal recebeu 4 doses, sendo cada uma de 10 µg de proteína recombinante AMA-1 e/ou FliC-MSP1₁₉-PADRE, em um volume final de 0,1 mL com intervalo de 15 dias.

A imunização com a proteína recombinante foi realizada por via subcutânea, com a proteína emulsificada em ACF, AIF ou em flagelina (FliC). O esquema de imunização utilizado está detalhado na Tabela 5.

Imunizações experimentais utilizando diferentes adjuvantes também foram realizadas. Para isso, grupos de 6 camundongos isogênicos BALB/c procedentes do Biotério do FCF-IQ/USP foram utilizados. Cada animal recebeu 4 doses, sendo cada uma de 10 µg (proteína), 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) da cauda (doses subsequentes), com a proteína emulsificada em AIF, Alum, Quil A, FliC, MPLA ou combinações (Alum + MPLA, Alum + FliC). Os animais do grupo

controle foram imunizados somente com os adjuvantes, dissolvidos em PBS. O esquema de imunização utilizado está detalhado na Tabela 6.

Tabela 4. Esquema de imunizações: testes de protocolos homólogos e heterólogos de indução e reforço com *PvAMA-1*.

Indução	Reforço (3 doses)
DNA controle	DNA controle
ACF	AIF
DNA (sem cardiotoxina)	DNA
DNA*	DNA
Proteína recombinante	Proteína recombinante
Proteína recombinante	DNA
DNA*	Proteína recombinante + AIF
DNA controle	Proteína recombinante + AIF
Proteína recombinante + ACF	Proteína recombinante + AIF

Tabela 5. Esquema de imunizações: testes de protocolos homólogos de indução e reforço com *PvAMA-1* e *FluC-MSP1₁₉-PADRE*.

Indução	Reforço (3 doses)
AMA-1	AMA-1
AMA-1 + AIF	AMA-1 + AIF
AMA-1 + FluC	AMA-1 + FluC
AMA-1 + FluC-MSP1 ₁₉ -PADRE	AMA-1 + FluC-MSP1 ₁₉ -PADRE
FluC-MSP1 ₁₉ -PADRE	FluC-MSP1 ₁₉ -PADRE

PADRE = Pan-Allelic DR epitope - epitopo universal para linfócitos T (CUNHA et al., 2001).

Todos 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.

Tabela 6. Esquema de imunizações: testes de protocolos homólogos de indução e reforço com PvAMA-1 em diferentes adjuvantes.

Indução	Reforço (3 doses)
AMA-1 + Alum	AMA-1 + Alum
AMA-1 + MPLA	AMA-1 + MPLA
AMA-1 + Alum + MPLA	AMA-1 + Alum + MPLA
AMA-1 + Quil A	AMA-1 + Quil A
AMA-1 + AIF	AMA-1 + AIF
AMA-1 + Alum + FliC	AMA-1 + Alum + FliC
AMA-1 + FliC	AMA-1 + FliC

9. Ensaio de Imunofluorescência Indireta

As imunofluorescências foram realizadas pelo grupo dos Profs. Laurent Renia e Bruce Russell, de Cingapura. Para isso, amostras de sangue de pacientes infectados por *P. vivax* foram coletadas após consentimento informado (Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Tropical, Universidade Mahidol, Tailândia, certificado de aprovação MUTM 2010-006-01 e da Universidade de Oxford, Centro de Vacinologia Clínica e Medicina Tropical, Reino Unido, OXTREC 027-025) foram obtidas e processados no prazo de 5 horas na Unidade de Pesquisa em Malária Shoklo, Tailândia. Glóbulos brancos e plaquetas foram removidos, e eritrócitos infectados foram cultivados até a fase de esquizontes em 2% de hematócrito em meio McCoy suplementado com 2,4 g/L de D-Glucose, 40 mg/mL de sulfato de gentamicina e 20% de soro humano AB inativado em uma atmosfera de 5% de O₂,

37°C por 22-44 horas. Esfregaços com as preparações de merozoítos livres e eritrócitos infectados por esquizontes maduros foram fixados com acetona gelada por 15 minutos e bloqueadas com 3% de BSA em PBS por 30 minutos a 37,5°C em incubadora umidificada. Soros de animais (1:100) imunizados com AMA-1 + Quil A ou AMA-1 + MPLA foram aplicados no esfregaço e incubados por 1 hora. O anticorpo secundário anti-IgG mouse conjugado com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) foi diluído 1:200 em PBS contendo 3% de BSA ou DAPI (Invitrogen). A presença de AMA-1 foi visualizada através de um microscópio de epifluorescência Nikon TS 100.

10. Análise da resposta celular induzida pela imunização com *PvAMA-1*.

10. 1. Detecção de IFN- γ no sobrenadante de cultura de células por ELISA de captura.

Grupos de 4 camundongos BALB/c (em função da disponibilidade no biotério) receberam três doses de 10 μ g da proteína *PvAMA-1* emulsificada em Alum, Alum + MPLA, Quil A e AIF, por via subcutânea, com intervalo de 15 dias. Os grupos controles foram: camundongos imunizados somente com PBS em Alum, Alum + MPLA, Quil A e AIF e não imunizados (*naive*). Quatorze dias após o esquema de imunizações os animais foram sacrificados e o baço foi retirado para obtenção de células mononucleares. Os baços foram macerados em PBS e o sobrenadante, rico em células, foi centrifugado a 2.500 rpm por 2 minutos, com tampão hemolítico. Após centrifugação, o tampão hemolítico foi desprezado e foi acrescentado 5 mL de meio RPMI contendo 10% de soro bovino fetal (Gibco). Após a contagem, as células

foram cultivadas em triplicata em meio RPMI 1640 (Sigma) completo pH 7,4. A proteína recombinante *PvAMA-1*, estéril, foi adicionada à cultura na concentração final de 1 ou 10 µg/mL. Após 5 dias, os sobrenadantes foram recolhidos para a dosagem de IFN-γ.

A detecção de IFN-γ foi realizada por ELISA de captura utilizando-se reagentes obtidos comercialmente (RD Systems). Resumidamente, placas de 96 poços (Costar 3590) foram sensibilizadas com anticorpo de captura anti-IFN-γ (4 µg/mL) diluído em PBS. Após incubação durante a noite a T.A., as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween e, em seguida, foi adicionado 100 µL/poço da solução de bloqueio (PBS - BSA 1%, azida sódica 0,05%). Após incubação a T.A., por 1 hora, foi adicionado 100 µL/poço de cada amostra em triplicata e uma nova incubação, por 2 horas, T.A. Após esta etapa de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween. O anticorpo de detecção foi diluído em diluente (0,1% BSA, 0,05% tween 20, em Tris salino) para uma concentração final de 100 µg/mL. Em seguida foi adicionado 100 µL/poço e incubado por 2 horas, T.A. Em seguida as placas foram lavadas mais 5 vezes e então adicionou-se 100 µL/poço do conjugado estreptavidina (1:200). Após uma nova incubação de 20 minutos, T.A., as placas foram lavadas por mais 3 vezes e foi adicionado 100 µL/poço de solução de revelação contendo OPD (1 mg/mL, Sigma), em tampão fosfato-citrato (pH 4,5-5,0). A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de uma solução contendo H₂SO₄ 4N. A DO₄₉₂ foi determinada em um leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Start Fax 2100). A concentração de IFN-γ em cada amostra foi determinada a partir de curvas padrão utilizando IFN-γ recombinante.

10.2. Análise da resposta proliferativa de células esplênicas de camundongos imunizados.

Grupos de 3 camundongos BALB/c foram imunizados conforme esquema descrito na Tabela 7. Quinze dias após a última dose de imunização, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e os respectivos baços foram isolados e homogenizados em meio RPMI para obtenção das células mononucleares. As células obtidas foram tratadas com 1 mL de tampão hemolítico por 1 minuto e centrifugadas a seguir (1.700 rpm/5 minutos/T.A.) Após 3 lavagens em meio RPMI (1.700 rpm/5 minutos/T.A.), as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI completo. A viabilidade das células foi avaliada utilizando-se azul de Trypan na diluição 1:10. A concentração das células foi ajustada para 6×10^6 /mL em meio RPMI completo. A divisão celular foi avaliada pelo corante vital CFSE (Carboxy-fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester, Molecular Probes) conforme descrito por (RIBEIRO et al., 2010). A técnica consiste na diminuição da intensidade da fluorescência a cada divisão celular. Inicialmente, 6×10^6 /mL células de baço foram ressuspensas em 1 mL de PBS pré aquecido a 37°C e incubados com CFSE na concentração final de 1 µM, por 10 minutos a 37°C, protegido da luz. Após este período, as células foram lavadas 3 vezes com RPMI completo e ressuspensas em 1 mL de RPMI completo. As células (3×10^5 /200 µL) foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato (Corning) na presença de *PvAMA-1* na concentração final de 10 µg/mL. Como controle positivo, as células foram estimuladas com 2,5 µg/mL do mitógeno Con A (Concanavalina A, Sigma). As células foram mantidas por 5 dias a 37°C, em atmosfera contendo 5% CO₂. Após este período, as células foram centrifugadas (1.700 rpm/5 minutos/T.A.) e ressuspensas em MACS *Buffer* (0,5% BSA, 2 mM EDTA, PBS). Em seguida, foram incubadas com os anticorpos monoclonais, anti-

CD3 APC-Cy7(1:100), anti-CD4 PerCP-Cy5.5 (1:200) e anti-CD8 PE-Cy7 (1:100) (todos da BD) por 30 minutos a 4°C. Após este período, as células foram lavadas como anteriormente e analisadas em citômetro de fluxo [FACSCantoll (Becton Dickinson)].

Os resultados foram expressos em porcentagem de células proliferando. O cálculo foi realizado pela subtração dos valores dos grupos imunizados com o antígeno AMA-1 e re-estimulados com Con A e AMA-1 pelo grupo que não recebeu nenhum estímulo.

10.3. Detecção intracelular de citocinas em camundongos imunizados com a proteína AMA-1 na presença de diferentes adjuvantes.

Células obtidas do baço foram cultivadas na concentração de 2×10^6 /poço (200 μ L), na presença de meio RPMI completo, Con A (2,5 μ g/mL) ou do antígeno PvAMA-1 (10 μ g/mL) + anti-CD28 (2 μ g/mL, BD). Como controle, utilizamos células sem estímulo. Após 6 horas de incubação das células a 37°C em estufa a 5% de CO₂, adicionou-se 10 μ g/mL de Brefeldina (Sigma) e retornaram para a incubação por mais 12 horas. Realizou-se a marcação com os anticorpos/fluorocromos descritos na Tabela 8. Para a marcação fluorescente, as células foram incubadas por 1 hora, a 4°C, ao abrigo da luz, com os anticorpos conjugados diluídos em MACS Buffer. As células foram lavadas e fixadas com formaldeído a 2% e submetidas a análise por FACS. Em torno de 1.000.000 eventos foram adquiridos para análises no software FlowJo (versão 9.3.3).

Tabela 7. Esquema de imunizações dos camundongos utilizados para os experimentos de citometria de fluxo.

Indução	Reforço (3 doses)
Alum	Alum
Alum + MPLA	Alum + MPLA
Quil A	Quil A
AIF	AIF
AMA-1 + Alum	AMA-1 + Alum
AMA-1 + Alum + MPLA	AMA-1 + Alum + MPLA
AMA-1 + Quil A	AMA-1 + Quil A
AMA-1 + AIF	AMA-1 + AIF

Tabela 8. Fluorocromos utilizados nos experimentos de citometria de fluxo.

Fluorocromo	Citocina	Diluição	Tipo de marcação
FITC	IL-2	1:100	Intracelular
PE	TNF- α	1:100	Intracelular
PercP = PECY5	CD4	1:100	Superfície
PECY7	CD8	1:100	Superfície
APC	IFN- γ	1:100	Intracelular
APCCY7	CD3	1:200	Superfície

11. Preparo das *beads* para ajuste das voltagens.

Para ajuste das voltagens no citômetro de fluxo, utilizamos *beads* de Compensação (BD) comerciais. As mesmas foram marcada com cada fluorocromo utilizado em cada experimento. O preparo das *beads* foi realizado adicionando uma

gota de *beads* negativa e uma gota de *beads* positiva em tubo do tipo eppendorf. Após 10 µL dessa solução foram distribuídos em novos tubos e cada fluorocromo foi adicionado na diluição indicada na Tabela 8. As mesmas foram incubadas por 15 minutos, 4°C, sob o abrigo da luz. Após esse período, 100 µL de MACS *buffer* foi adicionado em todos os tubos preparados, e em seguida adquiridas no citômetro para ajuste das voltagens individuais.

12. Proteína AMA-1 produzida em Boas Práticas de Laboratório (BPL)

Todos os ensaios descritos a partir deste tópico foram realizados pela Empresa Farmacore, a qual foi contratada para a produção da proteína recombinante PvAMA-1 em BPL.

12.1. Produção, purificação e caracterização da proteína AMA-1 de *P. vivax*.

Para a produção de 10 mg de proteína recombinante em BPL, o estudo foi composto em cinco etapas de trabalho:

Etapa 1: criação de banco de trabalho pela Farmacore;

Etapa 2: crescimento, expressão e produção da proteína;

Etapa 3: Processo de concentração

Etapa 4: Processo de cromatografia, purificação e envase do produto final

Etapa 5: Análise do produto final e controle da produção.

O experimento foi iniciado pela construção de bancos de referência das linhagens contendo o plasmídios. Após a criação do banco de referência em *E. coli* Top 10, uma grande quantidade de vetor foi preparada. O vetor pPIC9K-ama-1 foi

linearizado com *Bgl*II e utilizado para a transformação por eletroporação de células de *Pichia pastoris*, provenientes de estoque rastreável (Invitrogen). Após a seleção em meio de cultura, privado de histidina, os clones recombinantes foram selecionados em relação a sua capacidade de resistir a diferentes doses de geneticina. Ao final do processo, cinco clones resistentes a 4 mg/mL de geneticina foram obtidos. Os clones foram induzidos em pequenos volumes de cultura por tempos variáveis de 24, 48, 72 e 96 horas com 0,5% de metanol. A confirmação da presença da proteína de interesse foi realizada através de immunoblotting utilizando anticorpo anti-His. Um clone foi escolhido para experimento de indução em maior escala, foram realizados seis experimentos com volume de indução 500 mL cada. A amostra foi concentrada e colocada no tampão de equilíbrio. Após a cromatografia em HisTrap a amostra foi dessalinizada e concentrada em Tampão PBS contendo inibidores de protease (Roche). Ao final as amostras foram envasadas submetidas aos ensaios analíticos, SDS-PAGE, immunoblotting, IEF, SDS-PAGE gradiente 8-25, quantificação por BCA, dosagem de endotoxinas e esterilidade. Os frascos lacrados foram armazenados em freezer a -80°C. Os resultados do estudo demonstram que o mesmo foi conduzido de acordo com a proposta inicial acordada entre ambas as partes, respeitando as boas práticas de laboratório.

12.2. Eletroforese em gel gradiente SDS-PAGE 8-25 no sistema Phast System.

Este ensaio foi realizado utilizando-se o sistema PhastGel gradiente 8-25 (GE-Helthcare). A amostra foi aplicada próxima ao cátodo e o gel foi corrido no sistema Phast System (GE-Helthcare) nas condições descritas: 10mA, 3W, 65 V/H. A seguir: 50V, 0,1mA, 0,5W 410 V/h.

O gel foi fixado por 20 horas em solução fixadora (50% Metanol, 10% ácido acético e 40% H₂O). A seguir, o gel foi corado em corante de comassie blue R e descorado (40% Etanol, 10% ácido acético e 50% H₂O). O gel foi foto-documentado e analisado no software gelQuant.

12.3. Immunoblotting utilizando anticorpo Anti-His.

Após a resolução eletroforética das proteínas purificadas em gel SDS-PAGE 12%. O gel e os acessórios da transferência foram incubados por 15 minutos no tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3; glicina 192 mM e 20% metanol, previamente preparado e gelado). A transferência foi realizada durante uma hora e trinta minutos a 150 V, utilizando-se o sistema Mini Trans Blot Module TM (BioRAD). A seguir, a membrana foi lavada com tampão PBS e colocada na solução de bloqueio por uma hora. Após este período, a membrana foi lavada três vezes com o tampão de lavagem e mantida por duas horas, sob agitação, em 10 mL da solução bloqueio suplementada com o anticorpo monoclonal monoclonais anti-His (Abcan), diluído 1:1.000. Após a incubação, a membrana foi lavada novamente três vezes em PBS-Tween 0,05% e mantida por uma hora em 10 mL da solução de bloqueio, suplementada com o anticorpo secundário, produzido em cabra, contra IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Sigma), diluído 1:20.000. A seguir, foram adicionados à membrana 10 mL de tampão de revelação (contendo NBT e BCIP - Sigma). Após 10 minutos de incubação sem a incidência de luz, a membrana foi lavada com água milliQ e as bandas puderam ser visualizadas. A seguir, a membrana foi fotografada no Mini Bis Imaging System.

12.4. Eletroforese em gel IEF- Focalização Isoelétrica por PI (Ponto Isoelétrico), no sistema Phast System.

Este ensaio foi realizado utilizando-se o sistema PhastGel IEF 3-9, no equipamento Phast System (GE) com o intuito de avaliar a presença de contaminantes de mesmo tamanho molecular que pudessem ser separados por PI. Como o objetivo do ensaio não era a determinação exata do PI da proteína recombinante não foi utilizado padrão molecular para IEF. A amostra foi aplicada através do aplicador na posição próxima ao catodo. As condições de corrida foram: Pré-focalização: 2000 V, 2,5 mA, 3,5 W e 75 Vh . Aplicação da amostra 200 V, 2,5 mA, 3,5 W, 20 Vh e a corrida se deu a 2.000 V , 2,5 mA, 3,5 W e 410 Vh.

O gel foi fixado por 20 horas em solução fixadora. A seguir o gel foi corado em corante de comassie blue R e descorado.

12.5. Eletroforese em gel gradiente SDS-PAGE 8-25 no sistema Phast System

Este ensaio foi realizado utilizando-se o sistema PhastGel gradiente 8-25 (GE-Healthcare). A amostra foi aplicada próxima ao cátodo e o gel foi corrido no sistema Phast System GE-Healthcare nas seguintes condições: 10 mA, 3 W, 65 V/h. A seguir: 50 V, 0,1 mA, 0,5 W 410 V/h.

O gel foi fixado por 20 horas em solução fixadora. A seguir, o gel foi corado em corante de comassie blue R e descorado. O gel foi foto documentado e analisado no software gelQuant.

12.6. Quantificação de proteínas pelo método BCA

O Micro BCA Protein Assay Kit® é um ensaio colorimétrico que quantifica a proteína total na amostra testada pela redução do Cu^{2+} a Cu^{1+} por proteínas no meio alcalino. As amostras, o branco e a curva foram pipetados em microplacas em duplicata, logo após acrescentou-se o reagente de trabalho fornecido pelo KIT incubou-se durante 2 horas a 37°C e a leitura foi realizada em um leitor de ELISA com o filtro de 562 nm.

12.7. Ensaio Microbiológico de “Bioburden”

O teste microbiológico compreende uma cultura de 100 μL da amostra em 2 placas de 60 mm, uma contendo o meio Mueller-Hinton (MH) e a outra Sabouraud (S). A placa contendo MH, meio de cultura específico para crescimento de bactérias é incubada durante 72 horas a 37°C e a placa com Sabouraud, meio específico para o crescimento de fungos é incubada a 20°C durante 7 dias. Após estes períodos de incubação, se houver a presença de colônias, estas são contadas e registradas. Este ensaio é qualitativo, isto é, a presença de uma colônia já caracteriza a contaminação da amostra com um microrganismo vivo.

12.8. Ensaio cinético – cromogênico de detecção de endotoxina (K-QCL)

A amostra foi misturada ao reagente LAL/SUBSTRATO em quadruplicata, sendo que 2 poços foram utilizados para pipetar o controle positivo em uma quantidade conhecida (5 EU/mL). Os pontos da curva (0,005 a 50 EU/mL) e o branco foram pipetados em duplicata. As amostras e a curva foram colocadas em uma placa incubadora de leitura e monitoradas automaticamente até o

desenvolvimento de uma coloração amarela. O tempo necessário antes da aparição da cor amarela (tempo de reação) é inversamente proporcional a quantidade de endotoxina presente. Isto é, na presença de uma grande quantidade de endotoxina, a reação ocorre mais rapidamente; na presença de uma quantidade pequena de endotoxina, o tempo de reação é maior. A concentração de endotoxina nas amostras é calculada a partir da curva-padrão e o ensaio é considerado válido se o R^2 for de 0,98 a 1 e a recuperação do controle positivo for de 50 a 200%.

13. Imunizações experimentais com a proteína *PvAMA-1* produzida em Boas Práticas de Laboratório.

Após a obtenção da proteína *PvAMA-1* em Boas Práticas de Laboratório pela empresa Farmacore, demos início a novas imunizações experimentais utilizando adjuvantes selecionados. Para isso, grupos de 6 camundongos isogênicos BALB/c procedentes do Biotério do ICB/USP foram utilizados. Cada animal recebeu 4 doses, sendo cada uma de 10 µg (proteína), 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 a proteína emulsificada em MPLA, Alum + MPLA, Quil A e AIF. Os animais do grupo controle foram imunizados somente com os adjuvantes, dissolvidos em PBS. O esquema de imunização utilizado está detalhado na Tabela 9.

Todos 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.

Tabela 9. Esquema de imunizações: testes de protocolos homólogos de indução e reforço com PvAMA-1 produzida em BPL em adjuvantes selecionados.

Indução	Reforço (3 doses)
MPLA	MPLA
Alum + MPLA	Alum + MPLA
Quil A	Quil A
AIF	AIF
AMA-1 + MPLA	AMA-1 + MPLA
AMA-1 + Alum + MPLA	AMA-1 + Alum + MPLA
AMA-1 + Quil A	AMA-1 + Quil A
AMA-1 + AIF	AMA-1 + AIF

14. 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 títulos de anticorcos IgG dos grupos imunizados.

IV. RESULTADOS

1. Obtenção da proteína recombinante baseada no ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax* a partir de *Pichia pastoris*.

O gene correspondente a AMA-1 de *P. vivax* foi sintetizado comercialmente. Dentre as alterações efetuadas em relação ao gene previamente expresso em *E. coli* (RODRIGUES et al., 2005), tem-se a exclusão de três potenciais sítios de glicosilação, otimização do códon para a expressão em levedura e a inserção de sítios para a enzima de restrição *NotI* em ambas as extremidades, além de uma sequência codificando uma cauda de seis resíduos de histidina. No Anexo 1 está apresentado o alinhamento das seqüências de nucleotídeos correspondentes ao gene *PvAMA-1* previamente descrita e a sequência sintetizada, destacando-se as modificações realizadas para expressão em *Pichia pastoris*. No Anexo 2, encontram-se as respectivas seqüências de aminoácidos.

Para expressão da proteína recombinante em *Pichia pastoris*, o gene foi removido do vetor pUC57 e inserido no vetor de expressão pPIC9K como descrito no item 2.2 de Materiais e Métodos. O plasmídeo contendo o inserto na orientação correta foi selecionado por análise de restrição enzimática e confirmado por sequenciamento do DNA.

O plasmídeo pPIC9K-*Pvama-1* foi utilizado para transformar leveduras metilotróficas *Pichia pastoris* da linhagem GS115. As leveduras transformantes *His+* foram identificadas após 2-3 dias de incubação a 30°C. Realizamos um screening quanto a resistência à geneticina de 350 clones. Destes, nós obtivemos 15 clones resistentes a 0,5 mg/mL de geneticina, 7 clones resistentes à 2,0 mg/mL de geneticina e ainda 2 clones resistentes a 2,0 mg/mL de geneticina. Para análise da expressão em pequena escala (200 mL), selecionamos um clone que foi resistente a 2,0 mg/mL de geneticina. Alíquotas de cultura foram coletadas após 24, 48, 72 e 96

horas de indução com metanol e a expressão da proteína no sobrenadante foi analisada em SDS-PAGE 12% como poder ser observado na figura 6A. A expressão da proteína foi confirmada por immunoblotting utilizando anticorpo monoclonal anti-His (figura 6B). Como a expressão foi aumentando a cada nova indução, resolvemos manter sempre as induções da expressão até 96 horas.

Figura 6. Análise da expressão da proteína recombinante AMA-1 produzida em *Pichia pastoris*. **A.** Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie apresentando a cinética de indução da proteína na presença de metanol. Foram aplicados no gel 15 μ L do sobrenadante da cultura de cada indução; **B.** Detecção da proteína por immunoblotting utilizando anti-His. A proteína AMA-1 produzida a partir de *E. coli* foi inserida como controle positivo.

Posteriormente, foram estabelecidas as condições de purificação da proteína por cromatografia de afinidade utilizando resina contendo níquel conforme descrito no item 4 da metodologia. Como podemos observar na Figura 7, a proteína migra com massa molecular esperada (~53 kDa) e sem produtos de degradação.

Após obtenção da proteína recombinante purificada, analisamos se os epítomos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais contra o domínio II da proteína AMA-1 (GENTIL et al, 2010), estavam expostos nessa proteína. Para isso foram utilizados três anticorpos monoclonais que já estavam disponíveis no laboratório denominados

K₂39, K₂43 e K₂68. Esses anticorpos foram quanto ao reconhecimento da proteína AMA-1 em condições redutoras (presença de 2-ME) e não redutoras (ausência de 2-ME). Podemos observar que todos os anticorpos monoclonais reconhecem a proteína tanto na presença, como na ausência de 2-ME, sugerindo que o reconhecimento do epítopo é independente da conformação da mesma (Figura 8).

Figura 7. Análise da proteína recombinante AMA-1 purificada. Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie apresentando o perfil de migração da proteína recombinante AMA-1 (1 µg) produzida em *Pichia pastoris*, após purificação por cromatografia de afinidade.

2. Avaliação comparativa do reconhecimento imune das proteínas recombinantes baseadas em AMA-1 produzidas em bactérias e leveduras por anticorpos IgG de indivíduos com infecção patente por *P. vivax*.

Previamente, produzimos uma proteína recombinante baseada no ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax* em *E. coli* (RODRIGUES *et al.*, 2005). Esta proteína foi utilizada em diversos estudos avaliando a resposta imune humana naturalmente

Figura 8: Análise por imunoblotting da proteína recombinante AMA-1 em condições não redutoras (NR) e redutoras(R). Anticorpos monoclonais (K₂39, K₂43 e K₂68) foram avaliados quanto ao reconhecimento de AMA-1(1 µg) em condições não redutoras e redutoras (com 2-ME).

adquirida em indivíduos de áreas endêmicas de malária, os quais demonstraram que esta foi reconhecida por anticorpos IgG de pacientes infectados pelo *P. vivax* (RODRIGUES et al., 2005; MORAIS et al., 2006; BARBEDO et al., 2007; MÚFALO et al., 2008). A fim de avaliar se os epítomos reconhecidos na proteína AMA-1 produzida previamente em *E. coli* também estão presentes na proteína expressa em leveduras, as duas proteínas foram avaliadas comparativamente com relação ao reconhecimento imune por anticorpos IgG utilizando soros de 208 pacientes infectados pelo *P. vivax* procedentes de diferentes áreas endêmicas do Estado do Pará. O reconhecimento imune por anticorpos da proteína recombinante foi feito por ELISA utilizando placa sensibilizada com cada uma das proteínas recombinantes. A concentração das proteínas na placa foi ajustada de modo que fossem reconhecidas de forma semelhante pelo anticorpo monoclonal anti-His. Como pode ser observado na Figura 9, um alto coeficiente de determinação (r^2) foi obtido quando foram comparadas as reatividades de anticorpos entre as duas proteínas recombinantes

derivadas de AMA-1 ($r^2=0,93$), indicando que os epítomos reconhecidos nestas proteínas são similares.

Figura 9. Avaliação comparativa do reconhecimento das proteínas AMA-1 (*E. coli*) e AMA-1 (*Pichia pastoris*) por soros humanos. Amostras de soros de 208 indivíduos de áreas endêmicas de malária foram testadas, por ELISA, na diluição de 1:100, contra as duas proteínas recombinantes. Nos eixos estão determinadas as DO_{492} medidas para cada proteína por cada soro de paciente. Estão representados a linha de tendência e o r^2 no gráfico.

3. Avaliação da Imunogenicidade do antígeno AMA-1 em camundongos imunizados.

3.1. Avaliação do efeito da administração do antígeno AMA-1 em camundongos utilizando protocolos homólogos e heterólogos de indução e reforço com DNA plasmidial e/ou proteína recombinante.

A imunogenicidade da proteína AMA-1 produzida em *P. pastoris* foi avaliada após imunização de camundongos BALB/c utilizando protocolo homólogo e heterólogo de indução e reforço com DNA plasmidial e/ou proteína recombinante. As imunizações foram realizadas de acordo com o protocolo apresentado no item 9 de

Material e Métodos. A fim de comparar a resposta de anticorpos específicos induzida pelos diferentes protocolos testados, determinamos os títulos de anticorpos nos soros dos animais após cada dose de imunização. Esta determinação foi feita por ELISA utilizando placa sensibilizada com a proteína recombinante AMA-1 (ectodomínio). A Figura 10 apresenta os resultados expressos como média aritmética dos títulos de anticorpos ($\log_{10}$) $\pm$ SEM de cada grupo imunizado. Os resultados obtidos com os diferentes grupos, após cada imunização, foram comparados estatisticamente utilizando ANOVA *one-way*.

Os grupos que receberam o protocolo homólogo com 4 doses de DNA ou a indução com proteína (sem adjuvantes) e reforços com 3 doses de DNA não foram eficientes em induzir anticorpos específicos. Por outro lado, o protocolo homólogo com quatro doses da proteína ou indução com DNA e três doses de reforço com a proteína, foi capaz de induzir anticorpos específicos, porém os títulos obtidos foram significativamente mais baixos dos que os títulos obtidos nos grupos que receberam a proteína emulsificada em adjuvante ($p < 0,001$, em todos os casos).

Aparentemente, a indução com DNA foi eficiente, uma vez que após o primeiro reforço o grupo que recebeu o DNA recombinante apresentou títulos de anticorpos significativamente mais altos do que o grupo que recebeu o plasmídio vazio (ctr) ($p < 0,001$). Entretanto, após a terceira dose, não houve diferença significativa entre estes dois grupos. Ainda neste experimento, foi possível observar que a eficiência do DNA em induzir resposta de anticorpos específicos é dependente do tratamento prévio dos camundongos com cardiotoxina. Juntos, os dados obtidos sugerem que a eficiência da imunização com AMA-1 é dependente da proteína na presença de adjuvantes.

Figura 10. Análise da resposta de anticorpos IgG após a imunização de camundongos com a proteína recombinante AMA-1 e/ou DNA plasmidial. Camundongos foram imunizados quatro vezes com 100 µg (DNA) ou 10 µg (proteína recombinante produzida a partir de *P. pastoris*) com intervalo de 20 dias. A imunização com DNA plasmidial foi realizada por via intramuscular. A imunização com a proteína recombinante foi realizada por via subcutânea, com a proteína emulsificada em ACF/AIF. Os animais do grupo controle foram imunizados somente com o vetor plgSP vazio (ctr) ou ACF/AIF, dissolvidos em PBS. Os resultados estão expressos como média de títulos de cada grupo em $\log_{10} \pm \text{SEM}$. [n.s= não significativo $p > 0,05$; (*)= $p < 0,05$; (**)= $p < 0,01$ e (***)= $p < 0,001$].

Posteriormente selecionamos alguns grupos para a análise das subclasses de IgG gerada através desses protocolos de imunizações, e pudemos observar, como mostra a Figura 11 um predomínio de IgG1, IgG2a e IgG2b, caracterizando um padrão de resposta mista, do tipo Th1/Th2 para todos os grupos testados.

3.2 Avaliação do efeito da administração simultânea dos antígenos *PvAMA-1* e *FliC-MSP1₁₉-PADRE* em camundongos, na ausência de adjuvantes.

Uma vez que demonstramos que o antígeno *PvAMA-1* não tem propriedades

adjuvantes, resolvemos investigar se a administração simultânea deste com a proteína PvMSP1₁₉ fusionada à flagelina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (FliC), seria capaz de aumentar a imunogenicidade de AMA-1 na ausência de adjuvantes. A proteína de fusão FliC-MSP1₁₉-PADRE foi recentemente relatada pelo nosso grupo como sendo altamente imunogênica em camundongos, na ausência de adjuvantes (BARGIERI et al., 2008). Considerando-se que a combinação de múltiplos antígenos imunodominantes em uma vacina contra malária é uma estratégia que vem sendo investigada, resolvemos testar a eficiência de AMA-1 combinada a FliC-MSP1₁₉-PADRE. Para responder essa pergunta, as imunizações combinadas foram realizadas em camundongos C57BL/6, previamente caracterizados como bons respondedores para o epítipo PADRE. Em paralelo, as imunizações foram também realizadas com a proteína AMA-1 co-administrada a flagelina FliC recombinante.

Os resultados apresentados na Figura 12 mostram que após a quarta dose, o grupo imunizado com a proteína recombinante emulsificada em ACF/AIF, apresentou níveis de anticorpos contra AMA-1 significativamente mais altos quando comparados aos demais grupos ($p < 0,001$, em todos os casos). Observamos que embora os títulos de anticorpos no grupo que recebeu a combinação de proteínas AMA-1+FliC-MSP1₁₉-PADRE tenham sido mais alto em relação ao grupo que recebeu somente AMA-1 ($p < 0,01$), consideramos que esse protocolo não foi eficiente em potencializar a resposta de IgG contra AMA-1, uma vez que os títulos de anticorpos foram considerados baixos. De forma semelhante, a adição de FliC não potencializou a resposta de anticorpos contra AMA-1.

Em relação à resposta de anticorpos contra a PvMSP1₁₉ podemos observar um aumento gradativo nos níveis de anticorpos tanto dos animais imunizados com FliC-MSP1₁₉-PADRE como daqueles que receberam AMA-1+FliC-MSP1₁₉-PADRE

(Figura 12B), não havendo diferença estatisticamente diferente entre estes dois grupos ao final do esquema de imunizações ($p>0,05$). O que significa que a co-administração de FliC-MSP1₁₉-PADRE com AMA-1 não comprometeu a resposta para a PvMSP1₁₉. Como esperado, os animais imunizados com a proteína recombinante AMA-1 não apresentaram resposta de anticorpos contra PvMSP1₁₉. A única vantagem da imunização combinada AMA-1+FliC-MSP1₁₉-PADRE foi que a mesma foi capaz de gerar anticorpos contra as duas proteínas.

3.3 Imunizações em camundongos BALB/c utilizando testes de protocolos homólogos de indução e reforço com a proteína recombinante AMA-1 em diferentes adjuvantes.

Como já havia sido demonstrado, a proteína AMA-1 foi altamente imunogênica na presença do adjuvante ACF/AIF, adjuvante esse que é proibido para uso em testes clínicos e é usado com restrições em testes pré-clínicos. Com isso, selecionamos outros adjuvantes, inclusive adjuvantes licenciados pra uso no homem (Alum e MPLA) a fim de verificar a eficiência de cada um quando administrado com a proteína recombinante AMA-1. Para este experimento, camundongos BALB/c foram imunizados com a proteína AMA-1 na presença de AIF, Alum, Quil A, FliC, MPLA ou combinações (Alum + MPLA, Alum + FliC). Apesar das imunizações realizadas com AMA-1 + FliC em camundongos C57BL/6 não terem apresentado resultados significativos, resolvemos testar novamente essa combinação, agora em uma outra linhagem de camundongo e utilizando uma quantidade maior de FliC (10 µg). Os animais do grupo controle foram imunizados somente com os adjuvantes, dissolvidos em PBS. Os títulos de anticorpos IgG foram determinados por ELISA, duas semanas após cada dose.

Figura 12. Avaliação da resposta de anticorpos IgG contra a proteína AMA-1 (A) e MSP1₁₉ (B) após a imunização de camundongos com a proteína recombinante AMA-1 e/ou FliC-MSP1₁₉-PADRE. Camundongos C57BL/6 foram imunizados quatro vezes com 10 µg de proteína recombinante com intervalo de 15 dias. As imunizações foram realizadas por via subcutânea, com a proteína emulsificada em ACF/AIF ou FliC. Os resultados estão expressos como média de títulos de cada grupo em $\log_{10} \pm$ SEM. [n.s.= não significativo $p > 0,05$; (*)= $p < 0,05$; (**)= $p < 0,01$ e (***)= $p < 0,001$].

Os resultados estão apresentados na Figura 13 e a análise comparativa dos mesmos mostra que após a última dose, os grupos de animais imunizados com a proteína AMA-1 na presença de Quil A e AIF apresentaram níveis de anticorpos mais elevados que os demais grupos ($p < 0,001$). Os animais imunizados com a proteína AMA-1 na presença dos adjuvantes Alum + MPLA ou MPLA somente apresentaram títulos de anticorpos significativamente mais altos do que o grupo imunizado com a proteína recombinante na presença de Alum ($p < 0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos dos animais imunizados com a proteína AMA-1 na presença do adjuvante MPLA ou do grupo que recebeu a combinação de Alum + MPLA ($p > 0,05$). E ainda, os animais imunizados com AMA-1 + FliC apresentaram os níveis de anticorpos mais baixos, mas a administração de Alum + FliC foi capaz de aumentar a resposta de anticorpos significativamente ($p < 0,001$).

Quando realizamos a avaliação das subclasses de anticorpos IgG, observamos que as formulações que continham os adjuvantes Alum, MPLA, Alum + MPLA, FliC e Alum + FliC induziram uma resposta voltada para um padrão Th2, com predominância de anticorpos do tipo IgG1. Por outro lado, os grupos que receberam Quil A e AIF tiveram uma razão IgG1/IgG2a menor (IgG1/IgG2a= 2,17 e 1,33, respectivamente), indicando um balanceamento do padrão de resposta pelo aumento das respostas de IgG2a, como pode ser observado na Figura 14. Destaca-se a capacidade do adjuvante MPLA em induzir uma resposta menos polarizada para Th2 (IG1/IgG2a=74,67), em comparação ao Alum (IG1/IgG2a=170,70).

Figura 13. Comparação da resposta de anticorpos IgG após a imunização de camundongos com a proteína recombinante AMA-1 em diferentes adjuvantes. Os camundongos BALB/c (n=6) foram imunizados com quatro doses pela via s.c. com 10 µg da proteína recombinante na presença dos adjuvantes Alum, MPLA, FliC, Quil A, AIF, Alum + MPLA ou Alum + FliC. Os resultados estão expressos como média de títulos de cada grupo em $\log_{10} \pm \text{SEM}$. [n.s.= não significativo $p > 0,05$; (*)= $p < 0,05$; (**)= $p < 0,01$ e (***)= $p < 0,001$].

4. Reconhecimento da proteína nativa expressa em merozoítos de *P. vivax* por anticorpos anti-AMA-1

Anticorpos estão diretamente ligados à proteção contra os estágios sanguíneos do parasita da malária. Para determinar se as imunizações com a proteína recombinante AMA-1 de *P. vivax* induzia anticorpos semelhantes aos induzidos pelo parasita, foi realizado ensaio de imunofluorescência. Para isso, anticorpos policlonais anti-AMA-1 na presença do adjuvante Quil A e MPLA foram utilizados em experimentos de imunofluorescência indireta, realizados pelo grupo dos Profs.

Laurent Renia e Bruce Russell, de Singapura, conforme descrito no item 9 de Material e Métodos. Infelizmente não pudemos avaliar todos os anticorpos policlonais gerados através das imunizações devido a limitações de lâminas. Foi possível observar que esses anticorpos policlonais anti-AMA-1 gerados com ambos adjuvantes foram capazes de reconhecer a proteína nativa expressa em merozoítos de *P. vivax* obtidos através do sangue de pacientes infectados da Tailândia (Figura 15). No grupo controle, imunizado somente com o adjuvante Quil A não houve o reconhecimento, o que já era esperado.

Figura 14. Comparação do perfil de subclasses IgG após a imunização de camundongos com a proteína recombinante AMA-1 e diferentes adjuvantes. Os camundongos BALB/c foram imunizados como descrito na figura anterior. Os resultados estão expressos como razão IgG1/IgG2a $\pm$ SEM.

5. Avaliação da resposta imune celular induzida em camundongos após imunização com o antígeno PvAMA-1.

5.1. Detecção de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de células esplênicas estimuladas com AMA-1.

Para avaliar a resposta celular de animais imunizados com a proteína AMA-1,

Figura 15. Ensaio de Imunofluorescência indireta com soros de camundongos BALB/c após imunizações com a proteína recombinante AMA-1 na presença do adjuvante MPLA ou Quil A. Soros de animais (1:100) imunizados com PvAMA-1 + MPLA ou PvAMA-1 + Quil A foram aplicados no esfregaço e incubados por 1 hora. Em seguida adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG mouse conjugado com Alexa Fluor 488 ou DAPI. A presença de PvAMA-1 foi visualizada através de um microscópio de epifluorescência Nikon TS 100.

BALB/c foram imunizados com AMA-1 na presença dos adjuvantes Alum, Alum + MPLA, Quil A e AIF. Como controle, utilizamos camundongos *naïves* e camundongos imunizados somente com os respectivos adjuvantes. Após esquema de imunização, os camundongos foram sacrificados e as células esplênicas colocadas em cultura, e re-estimuladas com Con A ou com a proteína recombinante AMA-1. Após 5 dias de cultura de células, avaliamos a resposta celular, através da dosagem de interferon- γ (IFN- γ) produzido e secretado para o sobrenadante, por ELISA de captura como podemos observar na Figura 16. A O mitógeno Concanavalina A foi utilizado como controle positivo. Todos os grupos, incluindo o grupo *naïve*, produziram IFN- γ , não havendo diferença entre o grupo que recebeu a proteína na presença de adjuvante ou somente o adjuvante. Devido a esses

resultados, resolvemos investir nos ensaios de detecção intracelular de citocinas por FACS, por ser uma técnica mais sensível.

Figura 16. Análise da secreção de IFN- γ no sobrenadante de cultura celular. Após regime de imunizações (3 doses), as células dos baços dos grupos controles e imunizados com AMA-1 em diferentes adjuvantes foram retiradas e cultivadas em meio RPMI completo na ausência e presença do antígeno AMA-1 (1 e 10 μ g) por 5 dias em estufa de CO₂ a 37°C. Posteriormente o sobrenadante foi coletado para a dosagem de IFN- γ (pg/mL).

6. Análise da resposta proliferativa de células esplênicas de camundongos imunizados.

Para avaliar se as imunizações realizadas com o antígeno AMA-1, na presença dos diferentes adjuvantes induziria a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ específicos, selecionamos quatro grupos de animais, os quais foram imunizados na

presença de Alum, Alum + MPLA, Quil A e AIF. Quinze dias após terem recebido a última dose, os animais foram sacrificados e os respectivos baços isolados em meio RPMI. Após a maceração cuidadosa do órgão, um *pool* de baços de cada grupo foi preparado para a realização do experimento. As células esplênicas foram marcadas com 1 μ M de CFSE e incubadas por cinco dias com Con A (2,5 μ g/mL) ou com a proteína recombinante (10 μ g/mL). Como controle, células esplênicas foram cultivadas sem estímulo. A estratégia de análise utilizada foram os “*gates*”. Inicialmente realizamos um *gate* em linfócitos baseado em tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células, seguido por *gate* nas células T CD3+. Posteriormente, realizamos *Gates* para separar as sub-populações CD3+CD4+ ou CD3+CD8+ (linfócitos T CD4+ ou T CD8+, respectivamente). Dentro dessas sub-populações, avaliamos a diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE, conseguindo assim, verificar a proliferação específica induzida em cada grupo (Figura 17).

As figuras a seguir mostram que tanto as células CD3+CD4+, quanto às células CD3+CD8+ de ambos os grupos (controle e experimental) apresentaram alta porcentagem de proliferação quando estimuladas com o mitógeno Con A (Figura 18A e 18B). Como esperado, após a re-estimulação com o antígeno AMA-1, células CD3+CD4+ e CD3+CD8+ do grupo controle não proliferaram (Figura 18C). Nos grupos experimentais re-estimulados com AMA-1, tanto as células CD3+CD4+ como as células CD3+CD8+ também foram capazes de proliferar, sendo que inexplicavelmente as células CD3+CD8+ apresentaram porcentagem de células proliferando maiores do que as células CD3+CD4+ (Figura 18D).

Figura 17. Estratégia de análise utilizada para avaliação da proliferação celular através de ensaio com CFSE. Camundongos BALB/c foram imunizados quatro vezes pela vias s.c. com 10 µg da proteína AMA-1 na presença de diferentes adjuvantes. Os esplênócitos foram colocados em cultura quinze dias após a última dose e re-estimulados com 10 µg/mL da proteína recombinante durante 5 dias. A figura é um “Dot plot” representativo da estratégia de análise.

7. Detecção intracelular de citocinas em camundongos imunizados com a proteína AMA-1 na presença de diferentes adjuvantes.

Em paralelo com o experimento de proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ contra AMA-1, avaliamos a detecção intracelular de citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-2 produzidas após imunização e re-estímulo *in vitro*. Para isso, os mesmos grupos selecionados anteriormente (Alum, Alum + MPLA, Quil A e AIF) foram utilizados. Quinze dias após terem recebido a última dose, os animais foram sacrificados e os respectivos baços foram isolados em meio RPMI. Após a maceração cuidadosa do órgão, um *pool* de baços de cada grupo foi preparado para a realização do

experimento. As células esplênicas foram cultivadas na presença de meio RPMI completo, Con A (2,5 µg/mL) ou do antígeno AMA-1 (10 µg/mL). Após incubação de 6 horas, foi adicionado a Brefeldina, e as células foram novamente incubadas por mais 12 horas. Posteriormente, procedemos a marcação, como está descrito em Material e Métodos, item 11.3.

Novamente, a estratégia de análise utilizada foram os “*gates*”. Inicialmente realizamos um *gate* em linfócitos baseado em tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células, seguido por *gate* nas células T CD3+. Posteriormente, realizamos *Gates* para separar as sub-populações CD3+CD4+ ou CD3+CD8+ (linfócitos T CD4+ ou T CD8+, respectivamente). Dentro dessas sub-populações, avaliamos a produção das citocinas intracelulares IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Figura 19).

Na Figura 20 estão representados os resultados obtidos de detecção intracelular de IL-2 após 18 horas de cultura. Como podemos observar, conseguimos detectar essa citocina, mas em um nível pouco expressivo. No grupo que foi imunizado com Quil A + AMA-1 ou AIF + AMA-1 e re-estimulados com AMA-1 a detecção dessa citocina foi mais evidenciada do que nos demais grupos.

A detecção intracelular de TNF- α foi possível em todos os grupos imunizados, tanto re-estimulados com Con A como com AMA-1. Nesses resultados que estão apresentados na Figura 21, podemos observar que o grupo imunizado com AIF+AMA-1 apresentou níveis mais elevados de TNF- α , tanto nas células CD3+CD4+ como nas células CD3+CD8+ quando re-estimulado com AMA-1, seguido pelo grupo imunizado com Quil A + AMA-1.

Figura 18. Análise da resposta proliferativa de células esplênicas de animais imunizados com diferentes adjuvantes. Camundongos BALB/c foram imunizados 4 vezes pela vias s.c. com 10 µg da proteína AMA-1 na presença de diferentes adjuvantes. Os esplênócitos foram colocados em cultura quinze dias após a última dose e re-estimulados com 10 µg/mL da proteína recombinante durante 5 dias. Os resultados estão expressos em porcentagem de células proliferando. Nos gráficos estão representados os resultados dos grupos que foram imunizados somente com o adjuvante (A) e com o adjuvante + AMA-1 (B) e que foram re-estimulados com o mitógeno Con A. Nos gráficos (C) estão representados os resultados dos grupos que foram imunizados somente com o adjuvante e com o adjuvante + AMA-1 (D) e que foram re-estimulados com a proteína recombinante AMA-1.

Figura 19. Estratégia de análise utilizada para detecção intracelular de citocinas em camundongos imunizados. Camundongos BALB/c foram imunizados conforme descrito anteriormente. Os esplenócitos foram colocados em cultura quinze dias após a última dose e re-estimulados com 10 µg/mL da proteína recombinante ou 2,5 µg/mL de Con A, durante 18 horas. A figura é um “Dot plot” representativo da estratégia de análise.

A detecção intracelular de IFN- γ foi possível, mas em baixos níveis, tanto nos grupos re-estimulados com Con A como nos grupos re-estimulados com AMA-1, não apresentando diferença entre os grupos controles e os grupos experimentais (Figura 22).

Figura 20. Análise da produção de IL-2 por células esplênicas de animais imunizados com AMA-1. Camundongos BALB/c foram imunizados conforme descrito na Figura 19. Os esplenócitos foram colocados em cultura quinze dias após a última dose e re-estimulados com 10 µg/mL da proteína recombinante durante 18 horas. Os resultados estão expressos em % de células produzindo IL-2. Nos gráficos estão representados os resultados dos grupos que foram imunizados somente com o adjuvante (A) e com o adjuvante + AMA-1 (B) e que foram re-estimulados com o mitógeno Con A. No gráfico (C) estão representados os resultados dos grupos que foram imunizados somente com o adjuvante e com o adjuvante + AMA-1 (D) e que foram re-estimulados com a proteína recombinante AMA-1.

Figura 21. Análise da produção de TNF- α por células esplênicas de animais imunizados com AMA-1. Camundongos BALB/c foram imunizados conforme descrito na Figura 19. Os esplenócitos foram colocados em cultura quinze dias após a última dose e re-estimulados com 10 μ g/mL da proteína recombinante durante 18 horas. Os resultados estão expressos em % de células produzindo TNF- α . Nos gráficos estão representados os resultados dos grupos que foram imunizados somente com o adjuvante (A) e com o adjuvante + AMA-1 (B) e que foram re-estimulados com o mitógeno Con A. No gráfico (C) estão representados os resultados dos grupos que foram imunizados somente com o adjuvante (C) e com o adjuvante + AMA-1 (D) e que foram re-estimulados com a proteína recombinante AMA-1.

Figura 22. Análise da produção de IFN- γ por células esplênicas de animais imunizados com AMA-1. Camundongos BALB/c foram imunizados conforme descrito na Figura 19. Os esplenócitos foram colocados em cultura quinze dias após a última dose e re-estimulados com 10 μ g/mL da proteína recombinante durante 18 horas. Os resultados estão expressos em % de células produzindo IFN- γ . Nos gráficos estão representados os resultados dos grupos que foram imunizados somente com o adjuvante (A) e com o adjuvante + AMA-1 (B) e que foram re-estimulados com o mitógeno Con A. No gráfico (C) estão representados os resultados dos grupos que foram imunizados somente com o adjuvante e com o adjuvante + AMA-1 (D) e que foram re-estimulados com a proteína recombinante AMA-1.

8. Produção de PvAMA-1 em Boas Práticas de Laboratório pela companhia Farmacore.

Nosso protocolo de expressão e purificação da proteína PvAMA-1 a partir de *Pichia pastoris* foi reproduzido pela empresa Farmacore, dentro das Normas Regulatórias ABNT ISSO 9001:2000, ABNT 17025:2005 e critérios para o credenciamento de laboratórios de ensaios segundo os princípios de boas práticas de laboratório – BPL (INMETRO). A seguir, uma breve descrição das análises de qualidade do produto final.

8. 1. Eletroforese em gel gradiente SDS-PAGE 8-25 no sistema Phast System.

A análise de eletroforese foi realizada conforme descrito no item 13.2 de Material e Métodos. Podemos observar na Figura 23 que a proteína foi expressa com sucesso. Ao realizar a análise do gel de poliacrilamida no Software Gel Quant, para realizar o cálculo da pureza da amostra de acordo com a quantificação em massa das bandas, foi considerado um grau de pureza acima de 85% já que não foram observadas bandas secundárias.

8. 2. Immunoblotting utilizando anticorpo Anti-His.

Após a expressão um immunoblotting foi realizado utilizando anticorpo monoclonal anti-his conforme descrito no item 13.3 de Material e Métodos. E podemos observar na Figura 24 que houve o reconhecimento, confirmando assim a presença da cauda de histidina.

Figura 23. Análise da proteína recombinante PvAMA-1 purificada. (A) Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie apresentando o perfil de migração da proteína recombinante AMA-1 produzida em *Pichia pastoris*, após purificação por cromatografia de afinidade e troca iônica. **(1)** AMA-1; **(2)** Peso molecular. **(B)** Análise do gel de poliacrilamida no software Gel Quant. **(1)** AMA-1; **(2)** Peso molecular.

8. 3. Ensaio Microbiológico de “Bioburden”.

Após os períodos determinados pelos testes que caracterizam este ensaio, ou seja, de 72 horas para verificar crescimento bacteriano e de 7 dias para verificar crescimento de fungos, não houve o aparecimento de nenhuma colônia em ambos os testes, caracterizando assim, uma amostra livre de contaminantes.

8.4. Ensaio cinético – cromogênico de detecção de endotoxina (K-QCL)

Após o teste para verificar a concentração de endotoxina nas amostras, foi observado uma quantidade de 7,21 EU/mg, e uma recuperação do controle positivo de 100%.

Vale ressaltar que o nível máximo de endotoxina para a administração intravenosa em aplicações de produtos farmacêuticos e biológicos é definido como 5 unidades de endotoxina (EU) por Kg (peso) por hora, em todas as farmacopéias (revisto por MAGALHÃES et al., 2007).

Figura 24: Análise por immunoblotting da proteína recombinante AMA-1. (1) Proteína recombinante AMA-1; (2) Peso Molecular.

9. Imunizações experimentais com a proteína *PvAMA-1* produzida em Boas Práticas de Laboratório.

Em experimento anterior, utilizando a proteína recombinante *PvAMA-1* produzida em nosso laboratório, nós testamos diferentes adjuvantes, inclusive adjuvantes licenciados para o uso em humanos. Como o foco do nosso estudo é uma vacina contra a malária e futuramente imunizações em primatas não humanos, para avaliar as propriedades imunogênicas desta proteína produzida em Boas Práticas de Laboratório, nós selecionamos somente adjuvantes, que apresentaram

altos títulos de anticorpos anteriormente. Então, conforme descrito no item 14 de Material e Métodos, os animais foram imunizados com a proteína *PvAMA-1* emulsificada em MPLA, Alum + MPLA, Quil A e ainda AIF. Os resultados apresentados a seguir, na Figura 25, demonstram que altos títulos de anticorpos foram obtidos nas imunizações realizadas com a proteína emulsificada nos diferentes adjuvantes, sendo que, o grupo que recebeu a proteína emulsificada em AIF obteve títulos de anticorpos maiores do que a proteína emulsificada em Quil A ($p<0,05$) ou MPLA e Alum + MPLA ($p<0,001$). Vale ainda ressaltar que o grupo que recebeu a proteína emulsificada em Quil A também apresentou títulos de anticorpos maiores ($p<0,001$) do que o grupo que recebeu a proteína emulsificada em MPLA e não houve diferença estatística entre o grupo que recebeu Quil A e Alum + MPLA. Quando comparamos as imunizações realizadas com *PvAMA-1* emulsificada em MPLA ou em Alum + MPLA, podemos observar que o Alum ajudou a melhorar essa resposta, produzindo níveis de anticorpos maiores do que somente o MPLA ($p<0,001$).

Esses dados mostram então, que os resultados obtidos anteriormente com a proteína *PvAMA-1* produzida em nosso laboratório foram similares ao obtidos com a proteína *PvAMA-1* produzida em BPL, confirmando assim, que nossos resultados são reprodutíveis.

Figura 25. Comparação da resposta de anticorpos IgG após a imunização de camundongos com a proteína recombinante PvAMA-1 produzida em boas práticas de laboratório em diferentes adjuvantes. Os camundongos BALB/c (n=6) foram imunizados com quatro doses pela via s.c. com 10 µg da proteína recombinante na presença dos adjuvantes MPLA, Alum + MPLA, Quil A e AIF. Os resultados estão expressos como média de títulos de cada grupo em log₁₀ ± SEM. [n.s.= não significativo p>0,05; (*)=p<0,05; (**)=p<0,01 e (***)=p<0,001].

V. DISCUSSÃO

A malária é uma das prioridades da pesquisa mundial na área de desenvolvimento de vacinas, sendo o *Plasmodium vivax* a espécie com maior distribuição geográfica no mundo e a mais prevalente nas Américas. Apesar de uma contínua e crescente atividade de pesquisa nessa área, ainda não existe uma vacina capaz de impedir a infecção pelo *Plasmodium spp.* É nossa hipótese que uma formulação vacinal eficaz para a indução de resposta imune protetora contra o *P. vivax* deverá conter antígenos/adjuvantes capazes de gerar altos títulos de anticorpos, que atuarão bloqueando etapas críticas do desenvolvimento do parasito no homem (pré-eritrocítico e/ou eritrocítico).

Em estudos anteriores, demonstramos que proteínas recombinantes baseadas em AMA-1 de *P. vivax*, além de serem imunogênicas em infecções naturais (RODRIGUES et al., 2005; MORAIS et al., 2006; BARBEDO et al., 2007; MUFALO et al., 2008), também são capazes de induzir altos títulos de anticorpos em camundongos imunizados com antígenos obtidos utilizando sistemas bacterianos de expressão (MUFALO et al., 2008; GENTIL et al. (2010). A desvantagem do sistema bacteriano de expressão é que a maioria das proteínas derivadas de PvAMA-1, as quais representam o ectodomínio inteiro ou diferentes domínios, são obtidas de forma insolúvel, com exceção do domínio II (RODRIGUES et al., 2005; MUFALO et al., 2008). Apesar de termos padronizado um protocolo de solubilização/*refolding* eficiente, o rendimento final dos diferentes domínios é muito baixo, dificultando estudos pré-clínicos mais extensos. Com base nesses dados, na primeira etapa do presente estudo, geramos uma nova proteína recombinante contendo o ectodomínio de PvAMA-1, a qual foi produzida a partir da levedura *Pichia pastoris*. Para aumentar a eficiência de obtenção da proteína, utilizamos um gene sintético com códon

otimizado para expressão em leveduras, estratégia já utilizada previamente com sucesso por KOCKEN et al. (1999). Utilizando essa estratégia, obtivemos a proteína solúvel, secretada no sobrenadante e em bom nível de rendimento e pureza (Figura 7).

A fim de avaliar se os epítomos reconhecidos na proteína AMA-1 previamente produzida em *E. coli* também estão presentes na proteína expressa em leveduras, as duas proteínas foram avaliadas comparativamente com relação ao reconhecimento imune por anticorpos IgG utilizando soros de pacientes infectados pelo *P. vivax* procedentes de diferentes áreas endêmicas do Estado do Pará. O reconhecimento imune por anticorpos da proteína recombinante foi feito por ELISA utilizando placa sensibilizada com cada uma das proteínas recombinantes. Um alto coeficiente de determinação foi obtido quando foram comparadas as reatividades de anticorpos entre as duas proteínas recombinantes derivadas de PvAMA-1 ($r^2=0,93$), indicando que os epítomos reconhecidos nestas proteínas são similares (Figura 9).

Para avaliar o efeito da administração do antígeno PvAMA-1 em camundongos, utilizamos inicialmente protocolos homólogos e heterólogos de indução e reforço com DNA plasmidial e/ou proteína recombinante. Apesar do Adjuvante de Freund não ser apropriado para uso no homem, o mesmo foi incluído nesse estudo por ser considerado padrão ouro de indução de altos títulos de anticorpos. A fim de comparar a resposta de anticorpos específicos induzida pelos diferentes protocolos testados, determinamos os títulos de anticorpos nos soros dos animais após cada dose de imunização. Esta determinação foi feita por ELISA utilizando placa sensibilizada com a proteína recombinante homóloga. Como esperado, ao final do esquema de imunização

(4 doses), observamos que o protocolo baseado na proteína recombinante em ACF/AIF foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos, como demonstramos anteriormente com a proteína produzida em *E. coli* (MUFALO et al., 2008; GENTIL et al., 2010). No grupo que recebeu somente a proteína, na ausência de adjuvantes, detectamos baixos títulos de anticorpos, sugerindo que *PvAMA-1* não tem propriedades adjuvantes (Figura 10), assim como outros antígenos de malária já testados pelo nosso grupo (BARGIERI et al., 2008).

Para verificar a eficiência da imunização com DNA plasmidial na indução de anticorpos, grupos de animais receberam DNA codificando *PvAMA-1* ou DNA controle (vazio), seguido de três reforços com a proteína emulsificada em AIF. Com isso podemos observar que após a segunda dose, o grupo que recebeu DNA apresentou títulos de anticorpos significativamente mais altos do que o grupo que recebeu o DNA controle, o que demonstra que o DNA codificando *PvAMA-1* é funcional. Ao final do esquema de imunização, não observamos diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos e o grupo que recebeu a proteína em ACF/AIF. Entretanto, acreditamos que o efeito da imunização com DNA foi dependente de doses subsequentes com a proteína em adjuvante forte (AIF). Esse efeito pouco expressivo da imunização com DNA pode ser devido ao fato de que não otimizamos o gene para expressão em células de mamíferos, e isso pode ter comprometido a eficiência do DNA plasmidial na indução de anticorpos anti-*PvAMA-1*. Previamente, ROGERS et al. (1999) demonstraram que a imunização com DNA plasmidial contendo o gene *Pvama-1* foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos que reconheceram a proteína nativa por imunofluorescência.

Na tentativa de melhorar a indução de anticorpos sem a adição de

adjuvantes fortes e ao mesmo tempo gerar anticorpos contra dois antígenos imunodominantes de formas sanguíneas de *P. vivax*, avaliamos o efeito da administração simultânea da proteína *PvAMA-1* com a *PvFliC-MSP1₁₉-PADRE*, previamente produzida pelo nosso grupo (BARGIERI et al., 2008). A justificativa para a combinação com a *PvMSP1₁₉*, se deve ao fato de que diversos estudos já realizados pelo nosso grupo com essa proteína, demonstraram que a mesma é altamente imunogênica em camundongos e macacos (CUNHA et al., 2001; ROSA et al., 2004, ROSA et al., 2006), e é considerada importante candidata a vacina. Mais recentemente, a *PvMSP1₁₉* contendo o epítipo PADRE foi fusionada a flagelina FliC, que é considerada forte adjuvante natural indutor de TLR5 (BARGIERI et al., 2008). Nesse estudo, foi feita uma avaliação comparativa entre a imunogenicidade da proteína de fusão FliC-MSP1₁₉-PADRE e a MSP1₁₉-PADRE co-administrada a FliC. Os resultados demonstraram que a proteína foi altamente imunogênica, induzindo níveis elevados de anticorpos, tanto em fusão como na combinação com FliC. Entretanto, a proteína de fusão, foi capaz de gerar respostas mais duradouras (BARGIERI et al., 2008). Em nossos experimentos de co-administração de *PvAMA-1* com a FliC-MSP1₁₉-PADRE e *PvAMA-1* com FliC, observamos altos níveis de anticorpos somente no grupo imunizado com *PvAMA-1* na presença de ACF/AIF. Nos grupos imunizados somente com AMA-1, AMA-1 + FliC ou ainda AMA-1 + FliC-MSP1₁₉-PADRE, os títulos de anticorpos foram significativamente mais baixos. A única vantagem desse protocolo de imunização foi gerar anticorpos contra as duas proteínas simultaneamente, porém com predomínio de anticorpos contra a *PvMSP1₁₉*.

Como exposto anteriormente, a indução de altos títulos de anticorpos anti-

PvAMA-1 foi dependente do uso de um adjuvante forte como ACF/AIF, adjuvante este, não recomendado para uso em futuros testes pré-clínicos e clínicos. Nesse sentido, resolvemos testar adjuvantes alternativos, inclusive dois adjuvantes licenciados para uso no homem: Alum, MPLA, FliC, Quil A e Adjuvante de Freund (AIF). Segundo LEROUX-ROELS (2010), o conceito de que uma resposta imune aos antígenos pode ser melhorada foi demonstrada a cerca de cem anos atrás, quando sais de alumínio foram introduzidos na vacinação. Durante décadas as pesquisas sobre novas tecnologias em vacinas evoluíram a partir de antígenos bem caracterizados, como proteínas recombinantes e peptídeos. Os perfis de segurança das vacinas melhoraram, mas as utilizações destes antígenos altamente refinados necessitam ainda mais do uso de adjuvantes. O uso de adjuvantes permite a formulação de vacinas que estimulam seletivamente as vias imunológicas para obter um tipo desejado de resposta imune (humoral ou mediada por células).

Imunizações utilizando combinação de adjuvantes é comumente relatada e segundo MACLEOD et al. (2011), o Alum e o MPLA se complementam, onde o Alum fornece sinais para a geração de uma memória de longa duração ao passo que o MPLA aumenta a diferenciação de CTL. Além disso, a melhor compreensão da geração de células CD8 protetoras e também de células T de memória através da vacinação é essencial para o desenho racional de novas vacinas que visam a resposta imune celular. E este mesmo autor, relata que a imunização combinada desses dois adjuvantes licenciados para uso em humanos foi capaz de gerar células T CD8 de memória e que são capazes de proteger camundongos após o desafio.

Os nossos resultados comparando os diferentes adjuvantes mostrou que

os animais que receberam a proteína na presença de AIF e Quil A apresentaram níveis mais elevados de anticorpos IgG e uma resposta de isotipos mais balanceada, caracterizando um padrão do tipo Th1/Th2. Títulos de anticorpos mais baixos, mas também expressivos, foram obtidos na presença de Alum e das combinações Alum + MPLA e Alum + FliC (Figura 13).

Os sais de alumínio têm sido amplamente utilizados como adjuvantes para vacinas. O modo exato de ação desses sais permaneceu como uma incógnita durante anos. Antigamente acreditava-se que os sais de alumínio criavam um depósito no local do antígeno (persistência do antígeno) e com isso melhorava a atração e captação das células apresentadoras de antígenos (APCs). Mais recentemente tem sido sugerido que os antígenos adsorvidos em alumínio são apresentados em forma de partículas polivalentes, tornando-os mais eficientes (revisto por LEROUX-ROELS, 2010). Além disso, alguns estudos têm mostrado que o Alum pode estimular uma resposta do tipo Th2, o que implicaria 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 esforço para desenvolver uma vacina contra a gripe sazonal com menor reatogenicidade e preços mais acessíveis, QUINTILIO et al. (2009) caracterizaram a resposta ao adjuvante MPLA de *Bordetella pertussis*. Os testes relataram que concentrações baixas de MPLA de *B. pertussis*, adsorvida ou não em Al(OH)₃ é eficiente para induzir altos títulos de inibição de hemaglutinação em camundongos, mesmo com uma redução de 4 vezes na dose da vacina. Recentemente, MIYAKI et al. (2010), desenvolveram

condições para a produção de vacinas contra a gripe H5N1 com formulações contendo Al(OH)₃ e MPLA. Os dados mostraram que animais imunizados com a vacina de vírus inteiro inativado de H5N1 na presença destes dois adjuvantes em uma emulsão de esqualeno induzia títulos altos de hemaglutinação. Mesmo apresentando pequenos aumentos na imunogenicidade do vírus H5N1, esse valor poderia ter um impacto crucial em um cenário de pandemia, especialmente para uma população que nunca foi exposta a este vírus.

As subclasses de IgG demonstraram que todas as formulações que continham Alum e FliC induziram respostas predominantemente Th2. Mas também observamos que a utilização da proteína recombinante PvAMA-1 com a mistura dos adjuvantes Alum e FliC ou Alum e MPLA, alcançaram níveis melhores de anticorpos IgG do que as imunizações que utilizaram somente o Alum, além de induzir uma resposta mais balanceada do tipo Th1/Th2, o que é muito melhor para prevenir doenças como a malária.

Paralelamente a estes estudos, colaboramos com o Dr. Laurent Renia (Singapore Immunology Network, Biopolis) a fim de avaliar se os soros policlonais gerados no presente estudo seriam capazes de reconhecer a proteína expressa em isolados de *P. vivax* da Tailândia. Observamos que os anticorpos gerados em camundongos com os protocolos de imunização utilizando Quil A e MPLA foram capazes de reconhecer o parasita, por imunofluorescência (Figura 15). É importante ressaltar que a proteína recombinante AMA-1 gerada em nosso estudo foi obtida a partir de um isolado de *P. vivax* da Amazônia, portanto o fato dos soros policlonais reconhecerem um isolado da Ásia mostra que a diversidade genética dos parasitas não está interferindo em nosso sistema.

Uma das grandes limitações dos estudos com *P. vivax*, é o fato de não dispormos de um ensaio funcional para avaliar se anticorpos induzidos experimentalmente contra antígenos de *P. vivax* são capazes de inibir a reinvasão do parasita *in vitro*. Isso se deve ao fato de o *P. vivax* invadir exclusivamente reticulócitos, que representam apenas uma população pequena dos eritrócitos do sangue periférico. Além disso, pacientes infectados pelo *P. vivax* apresentam uma densidade parasitária muito baixa. No final de 1980, dois grupos de pesquisa desenvolviam de forma independente uma estratégia promissora para superar esses obstáculos. O objetivo era criar as melhores condições para a invasão através da mistura de esquizontes maduros e reticulócitos. Em ambos os casos o enriquecimento foi conseguido por centrifugação do sangue total ou pela maturação de células vermelhas infectadas pelo *P. vivax* em gradiente de densidade. MONS et al. (1988) avaliaram o protocolo a partir de 13 pacientes ou através de macacos *Aotus* infectados utilizando reticulócitos de inúmeras fontes, inclusive de cordão umbilical humano. A eficiência da invasão de reticulócitos humanos enriquecidos foi relativamente baixa (parasitemias pós-invasão 0,2%- 2,5%). O protocolo desenvolvido por BARNWELL et al. (1989) levou a uma eficiência de invasão significativamente melhor. Utilizando sangue de macacos infectados com *P. vivax* cepa Belém, obtiveram uma parasitemia adequada (3 a 14%) após a invasão dos reticulócitos enriquecidos a partir do sangue periférico. Recentemente, RUSSELL et al. (2011) descreveram um protocolo de ensaio de reinvasão *ex vivo*, baseado em uma mistura de reticulócitos de cordão umbilical, maturado, e enriquecido com esquizontes de *P. vivax* de isolados clínicos. A confiabilidade deste ensaio foi demonstrada utilizando um grande

painel de isolados recém coletados de pacientes na Tailândia. A partir da publicação desse trabalho, contatamos o Dr. Bruce Russel que testou os soros policlonais anti-*PvAMA-1* em ensaios da inibição da reinvasão de três isolados da Tailândia. Os resultados foram bastante promissores, uma vez que a inibição da invasão pelo *pool* de soro anti-*PvAMA-1* (imunizado em Quil A) variou entre 10,8% a 34,2% (dados não mostrados).

Para caracterizar o perfil de citocinas induzidas pela imunização com a proteína *PvAMA-1*, inicialmente avaliamos a presença de IFN- γ no sobrenadante da cultura de células esplênicas de animais imunizados na presença de ACF/AIF, após re-estímulo com *PvAMA-1* ou Con A. Infelizmente, esse experimento não foi conclusivo, uma vez que, todos os grupos testados, inclusive o grupo *naïve* ou até mesmo os grupos imunizados somente com adjuvante secretaram IFN- γ . Em função desses resultados, resolvemos testar uma estratégia alternativa para detectar citocinas utilizando marcação intracelular por citometria de fluxo. Em paralelo, avaliamos a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ por ensaio utilizando CFSE.

Para isso, selecionamos quatro grupos de animais imunizados com Alum, MPLA, Quil A e AIF como controles e grupos imunizados com a proteína *PvAMA-1* na presença desses mesmos adjuvantes para a realização desses ensaios. Na figura 18 estão apresentados os resultados obtidos nos ensaios de proliferação celular, onde observa-se que as células esplênicas, tanto dos grupos controles como dos grupos experimentais foram capazes de proliferar quando estimuladas com o Con A, como esperado. As células dos grupos imunizados com a proteína na presença dos diferentes adjuvantes e re-estimuladas com *PvAMA-1*, tanto as células CD3⁺CD4⁺ como as células

CD3+CD8+ foram capaz de proliferar, sendo que o índice de estimulação foi maior nos grupos que receberam a proteína em Alum ou em Alum + MPLA.

Fizemos várias tentativas com o objetivo de detectar a expressão intracelular das citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ , tanto por células CD3+CD4+ como por células CD3+CD8. Entretanto, os níveis de detecção foram sempre muito baixos. Não houve tempo hábil para aprofundarmos em experimentos para explicar esse resultado, mas é possível que o fato de utilizarmos proteínas recombinantes como estímulo nas culturas não tenha sido uma boa estratégia. Em trabalhos publicados para a detecção de citocinas intracelulares realizados com peptídeos, para doenças como febre amarela, HIV e Malária, os resultados obtidos são mais satisfatórios, mostrando que esse tipo de ensaio é muito mais sensível quando se utiliza peptídeos ao invés de proteínas recombinantes (AKONDY et al., 2009, RIBEIRO et al., 2010, SEDEGAH et al., 2010).

Visando futuras imunizações em primatas não humanos, a proteína recombinante *PvAMA-1* foi produzida em boas práticas de laboratório pela empresa Farmacore, reproduzindo nosso protocolo. Após a seleção de um novo clone, a expressão da mesma foi realizada com sucesso e foram realizados ensaios que confirmaram a expressão, a presença da cauda de histidina e ainda ensaios que mostraram que este antígeno encontra-se livre de contaminações e de endotoxinas.

Com essas proteínas em mãos, demos início a novas imunizações experimentais, utilizando a mesma na presença de adjuvantes selecionados, MPLA, Quil A e AIF. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 25, e pudemos observar que altos títulos de anticorpos foram gerados para todos os

grupos, validando assim nossos experimentos anteriores.

A pesquisa de uma vacina contra a malária tem testado muitos antígenos candidatos em roedores para determinar a imunogenicidade e avaliar a eficácia. Embora essas abordagens possuam suas vantagens, como a de estar prontamente disponível e relativamente acessível, há limitações consideráveis, como o fato de que malária humana poderiam não infectar camundongos e roedores, o que significa que modelo murino não poderia ser utilizado para avaliar a eficácia. Além disso, há diferenças importantes na resposta imune entre ratos e seres humanos quanto à patogenia da malária. Com isso os testes de uma vacina deveriam ser realizados em primatas não humanos, mas esta é uma condição com disponibilidade limitada, já que para esses testes, não são liberados todas as espécies de animais e os que são, possuem baixa disponibilidade e com custo elevado. Dadas as limitações de modelos animais para testar as vacinas contra a malária, a segurança e a imunogenicidade devem ser determinadas tão rapidamente quanto for possível (revisto por RICHARDS, BEESON, 2009).

Por fim, concluímos que os dados obtidos no presente estudo poderão ser úteis na seleção de estratégias vacinais para futuros testes clínicos de fase I no homem.

VI. CONCLUSÕES

1. A proteína *PvAMA-1* foi obtida com sucesso a partir da expressão secretada em *Pichia pastoris*, com rendimento satisfatório. Adicionalmente, o protocolo padronizado em nosso laboratório foi reproduzido de forma independente pela companhia Farmacore, dentro das normas regulatórias;
2. Após imunização de camundongos BALB/c utilizando diferentes protocolos, concluímos que o protocolo homólogo com a proteína recombinante emulsificada em adjuvante de Freund foi o mais eficiente na indução de altos títulos de anticorpos;
3. Formulações alternativas, contendo a proteína *PvAMA-1* na presença dos adjuvantes AIF, Quil A, Alum, MPLA e Alum + MPLA, também foram eficientes na indução de anticorpos, os quais foram capazes de reconhecer o parasita por imunofluorescência (Quil A e MPLA);
4. A imunização com *PvAMA-1* foi capaz de induzir respostas proliferativas de células esplênicas CD3⁺ de camundongos imunizados após re-estimulação com o antígeno *in vitro*. Por outro lado, baixos níveis de citocinas foram detectados;
5. Em conjunto, nossos resultados demonstram que a proteína *PvAMA-1* mostrou-se promissora para continuar sendo explorada em imunizações pré-clínicas.

VII. REFERÊNCIAS

- AKONDY, R. S.; MONSON, N. D.; MILLER, J. D.; EDUPUGANTI, S.; TEUWEN, D.; et al. The Yellow Fever Virus Vaccine Induces a Broad and Polyfunctional Human Memory CD8₊ T Cell Response. **J. Immunol.** 7919-30, 2009.
- 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.** 12:220-4, 2006.
- ANDERS, R. F.; CREWETHER, P. E.; EDWARDS, S.; MARGETTS, M.; MATTHEW, M. L.; POLLOCK, B.; PYE, D. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. **Vaccine.** 16: 240-7, 1998.
- 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 against flagellin. **J Immunol.** 175:3882-91, 2005.
- ARÉVALO-HERRERA, M.; CHITNIS, C.; HERRERA, S. Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. **Hum Vaccin.** 6:124-32, 2010.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; TONGREN, J. E.; RILEY, E. M. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. **Clin Exp Immunol.** 133(2):145-52. 2003
- BARBEDO, M. B.; RICCI, R.; JIMENEZ, M. C. S.; CUNHA, M. G.; YAZDANI, S. S.; CHITNIS, C. E. RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 102: 335-9, 2007.
- BARGIERI, D. Y.; ROSA, D. S.; BRAGA, C. J.; CARVALHO, B. O.; COSTA, F. T.; ESPÍNDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; SOARES, I. S.; FERREIRA, L. C.; 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.** 48: 6132-42, 2008.
- 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 Res.** 2011:965369, 2011.
- BARNWELL, J. W.; NICHOLS, M. E.; RUBINSTEIN, P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. **J Exp Med.** 169: 1795-1802, 1989.
- BREWER, J. M. (How) do aluminium adjuvants work? **Immunol. Lett.** 102:10-5, 2006.

- BOSCARDIN, S. B.; KINOSHITA, S.S.; FUJIMURA, A. E. RODRIGUES. M.M. Immunization with cDNA expresser by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. **Infect. Immun.** 71: 2744-57, 2003.
- BOUILLET, L. É.; DIAS, M. O.; DORIGO, N. A.; MOURA, A. D.; RUSSELL, B.; NOSTEN, F.; RENIA, L.; BRAGA, E. M.; GAZZINELLI, R. T.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S.; BRUNA-ROMERO, O. Long-term humoral and cellular immune responses elicited by a heterologous *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 protein prime/adenovirus boost immunization protocol. **Infect Immun.** 79: 3646-52, 2011.
- CAETANO, B. C.; BRUÑA-ROMERO, O.; FUX, B.; MENDES, E. A.; PENIDO, M. L.; GAZZINELLI, R. T. Vaccination with replication deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. **Hum Gene Ther.** 17(4): 415-26, 2006.
- CARLTON, J. M.; ADAMS, J. H.; SILVA, J. C.; BIDWELL, S. L.; LORENZI, H.; CALER, E.; CRABTREE, J.; ANGIUOLI, S. V.; MERINO, E. F.; et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Nature.** 455:757-63, 2008.
- 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 Amazon region: an exception? **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 101(10): p. 1042-1044, 2007.
- CHENG, Q.; SAUL, A. Sequence analysis of the apical membrane antigen 1 (AMA-1) of *Plasmodium vivax*. **Mol Biochem Parasitol.** 65: 183-7, 1994.
- CHUNG, J. Y.; CHUN, J. H.; KHO, W. G. Analysis of the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 gene from re-emerging Korean isolates. **Parasitol Res.** 90: 325-9, 2003.
- COSTA, F.; FRANCHIN, G.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; RIBEIRÃO, M.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M. M. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Vaccine.** 16: 768-74, 1998.
- COGNE, M.; BALLEET, J. J.; SCHMITT, C.; BIZZINI, B. Total and IgE antibody levels following booster immunization with aluminum absorbed and non absorbed tetanus toxoid in humans. **Ann Allergy.** 54:148-51, 1985.
- COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. **Cell.** 124: 755-766, 2006.

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**. 29: 492-503, 2010.

COLLINS, W. E.; PYE, D.; CREWETHER, P. E.; VANDENBERG, K. L.; GALLAND, G. G.; SULZER, A. J.; KEMP, D. J.; EDWARDS, S. J.; COPPEL, R. L.; SULLIVAN, J. S.; MORRIS, C. L.; ANDERS, D. F. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 51: 711-9, 1994.

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.

CREWETHER, P. E.; CULVENOR, J. G.; SILVA, A.; COOPER, J. A.; ANDERS, R. F. *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. **Exp. Parasitol.** 70:193 - 206, 1990.

CREWETHER, P. E.; MATTHEW, M. L.; FLEGG, R. H.; ANDERS, R. F. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. **Infect. Immun.** 64: 3310-7, 1996.

CULLETON, R.; NDOUNGA, M.; ZEYREK, F. Y.; COBAN, C.; CASIMIRO, P. N.; TAKEO, S.; TSUBOI, T.; YADAVA, A.; CARTER, R.; AND TANABE K. Evidence for the Transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of the Congo, West Central Africa. **J Infect Dis**. v. 200: p. 1465–1469, 2009.

DEANS, J.A.; JEAN, W.C. Structural studies on a putative protective *Plasmodium knowlesi* merozoite antigen. **Mol. Biochem. Parasitol.** 26:155-166, 1987.

DEANS, J. A.; KNIGHT, A. M.; JEAN, W. C.; WATERS, A. P.; COHEN, S.; MITCHELL, G. H. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. **Parasite Immunol.** 10:535-52, 1988.

DUTTA, S.; LALITHA, P. V.; WARE, L. A.; BARBOSA, A.; MOCH, J. K.; VASSELL, M. A.; FILETA, B. B.; KITOV, S.; KOLODNY, N.; HEPPNER, D. G.; HAYNES, J. D.; LANAR, D. E. Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 expressed in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 70: 3101-10, 2002.

DUTTA, S.; HAYNES, J. D.; BARBOSA, A.; WARE, L. A.; SNAVELY, J. D.; MOCH, J. K.; THOMAS, A. W.; LANAR, D. E. Mode of action of invasion-inhibitory antibodies directed against apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum*. **Infect. Immun.** 73: 2116-22, 2005.

FENG, Z. P.; KEIZER, D. W.; STEVENSON, R. A.; YAO, S.; BABON, J. J.; MURPHY, V. J.; ANDERS, R. F.; NORTON, R. S. Structure and inter-domain interactions of domain II from the blood-stage malarial protein, apical membrane antigen 1. **J Mol Biol.** 350: 641-56, 2005.

FIGTREE, M.; PASAY, C. J.; SLADE, R.; CHENG, Q.; CLOONAN, N.; WALKER, J.; SAUL, A. *Plasmodium vivax* synonymous substitution frequencies, evolution and population structure deduced from diversity in AMA-1 and MSP 1 genes. **Mol Biochem Parasitol.** 108: 53-66, 2000.

GAUR, D.; MAYER, D. C.; MILLER, L. H. Parasite ligand-host receptor interactions during of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **Int J Parasitol.** 34: 1413-29, 2004.

GENTIL, F.; BARGIERI, D. Y.; LEITE, J. A.; FRANÇO SO, 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: 6183 – 90, 2010.

GIRARD, M. P.; REEDB, Z. H.; FRIEDE, M.; KIENY, M. P. A review of human vaccine research and development: malaria. **Vaccine.** 25: 1567-1580, 2007.

GOTO, N.; KATO, H.; MAEYAMA, J.; ETO, K.; YOSHIHARA, S. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. **Vaccine.** 11:914-8, 1993.

GUERRA, C. A.; SNOW, R. W.; HAY, S. I. Mapping the global extent of malaria in 2005. **Trends Parasitol.** 22:353-358, 2006

HAFALLA, J. C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunol Rev** 240: 297-316, 2011.

HAN, E. T.; PARK, J. H.; SHIN, E. H.; CHOI, M. D.; CHAI, J. Y. Apical membrane antigen – 1 (AMA-1) gene sequences of re-emerging *Plasmodium vivax* in South Korea. **Korean J Parasitol.** 40:157-62, 2002.

HAY, S. I.; GUERRA, C. A.; TATEM, A. J.; NOOR, A. M.; SNOW, R. W. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and the future. **Lancet Infect Dis.** 4: 327-36, 2004.

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.** 410:1099-103, 2001.

HEALER, J.; MURPHY, V.; HODDER, A. N.; MASCIANTONIO, R.; GEMMILL, A. W.; ANDERS, R. F.; COWMAN, A. F.; BATCHELOR, A. Allelic polymorphisms in apical membrane antigen – 1 are responsible for evasion of antibody-mediated inhibition in *Plasmodium falciparum*. **Mol Microbiol.** 52: 159-68, 2004.

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.; CHEN-MOK, M.; CORRADIN, G.; ARÉVALO-HERRERA, M. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in colombian malaria-naïve volunteers by a *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. **Am J Trop Med Hyg** 73: 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.

HODDER, A. N.; CREWETHER, P. E.; ANDERS, R. E. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. **Infect. Immune.** 69: 3286-94, 2001.

HOFFMAN, S. L.; MILLER, L. Perspectives on malaria vaccine development. **Malaria vaccine development**, ASM Press, Washington, p. 1-13, 1996.

HOLDER, A. Preventing the merozoite invasion of erythrocyte. **Malaria vaccine development: a multi-immune response approach**, ASM Press, Washington, p. 77-104, 1996.

HOLLINGDALE, M. R. Anti-sporozoite antibodies. **Bull World Health Organ.** 68: 47-51, 1990.

HOWELL, S. A.; WITHERS-MARTINEZ, C.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BLACKMAN, M. J. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen – 1. **J. Biol Chem.** 276:31311-20, 2001.

HOWELL, S. A.; WELL, I.; FLECK, S. L.; KETTLEBOROUGH, C.; COLLINS, C. R.; BLACKMAN, M. J. A single malaria merozoite serine protease mediated shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. **J. Biol. Chem.** 278: 23890 - 8, 2003.

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.

HWANG, S. Y.; KIM, S. H.; KHO, W. G. Genetic characteristics of polymorphic antigenic markers among Korean isolates of *Plasmodium vivax*. **Korean J Parasitol.** 47: S51-8, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Portaria Inmetro/ NIT-DICLA-035, de Julho de /2009. **PRINCÍPIOS DAS BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO – BPL**. Disponível em: < <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/laboratorios/bpl.asp>>. Acesso em: 10 jun. 2011.

KENNEDY, M. C.; WANG, J.; ZHANG, Y.; MILES, A. P.; CHITSAZ, F.; SAUL, A.; LONG, C. A.; MILLER, L. H.; STOWERS, A. W. In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. **Infect. Immun.** 70: 6948-60, 2002.

KOCKEN, C. H.; DUBBELD, M. A.; VAN DER WEL, A.; PRONK, J. T.; WATERS, A. P.; LANGERMANS, J. A.; THOMAS, A. W. High-level expression of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 (AMA-1) in *Pichia pastoris*: strong immunogenicity in *Macaca mulatta* immunized with *P. vivax* AMA-1 and adjuvant SBAS2. **Infect. Immun.** 67: 43-9, 1999.

KOCKEN, C. H.; NARUM, D. L.; MASSOUGBODJI, A.; AVIVI, B.; DUBBELD, M. A.; VAN DER WEL, A.; CONWAY, D. J.; SANNI, A.; THOMAS, A. W. Molecular characterization os *Plasmodium reichenowi* apical membrane antigen – 1 (AMA-1), and antibody-mediated inhibition of red cell invasion. **Mol Biochem Parasitol.** 109: 147-56, 2000.

KOCKEN, C. H.; WITHERS-MARTINEZ, C.; DUBBELD, M. A.; VAN DER WEL, A.; HACKETT, F.; VALDERRAMA, A.; BLACKMAN, M. J.; THOMAS, A. W. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. **Infect. Immun.** 70:4471-6, 2002.

KONGKASURIYACHAI, D.; BARTELS-ANDREWS, L.; STOWERS, A.; COLLINS, W. E.; SULLIVAN, J.; SATTABONGKOT, J.; TORII, M.; TSUBOI, T.; KUMAR, N. Potent immunogenicity of DNA vaccines encoding Plasmodium vivax transmission – blocking vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 – evaluationof homologous and heterologous antigen – delivery prime-boost strategy. **Vaccine.** 13;22(23-24):3205-13, 2004.

KUMAR, S.; MILLER L, QUAKYI. I.; HOUGHTEN, R.; MALOY, W.; MOSS, B.; BERZOFISKY, J.; GOOD, M. Cytotoxic T cells specific for the circumsporozoites protein of *Plasmodium falciparum*. **Nature** 334: 258-160, 1988.

LALITHA, P. V.; WARE, L. A.; BARBOSA, A.; DUTTA, S.; MOCH, J. K.; HAYNES, J. D.; FILETA, B. B.; WHITE, C. E.; LANAR, D. E. Production of the subdomains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 ectodomain and analysis of the immune response. **Infect. Immun.** 72: 4464 - 70, 2004.

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

LEROUX-ROELS, G. Unmet needs in modern vaccinology adjuvants to improve the immune response. **Vaccine**. C25-C36, 2010.

LI, S.; SCHULMAN, J.L.; MORAN, T.; BONA, C.; PALESE, P. Influenza A virus transfectants with chimeric hemagglutinins containing epitopes from different subtypes. **J Virol** 66:399-404, 1992.

LI, F.; DLUZEWSKI, A.; COLEY, A.M.; THOMAS, A.; TILLEY, L.; ANDERS, R. F.; FOLEY, M. Phage-displayed peptides bind to the malarial protein apical membrane antigen-1 and inhibit the merozoite invasion of host erythrocytes. **J. Biol. Chem.** 277: 50303–10, 2002.

LIGHTFIELD, K. L.; PERSSON, J.; BRUBAKER, S. W.; WITTE, C. E.; VON MOLTKE, J.; DUNIPACE, E. A.; HENRY, T.; SUN, Y. H.; CADO, D.; DIETRICH, W. F.; MONACK, D. M.; TSOLIS, R. M.; VENCE, R. E. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. **Nat. immunol.** 9: 1171 – 78, 2008.

LU, S. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr Opin Immunol.* 21: 346-351, 2009.

MACHADO, A. V.; CARDOSO, J. E.; CLASER, C.; RODRIGUES, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; BRUNA-ROMERO, O. Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. **Hum. Gene Ther.** 17(9): 898-908, 2006.

MACLEOD, M. K. L.; MCKEE, A. S.; DAVID, A.; WANG, J.; MASON, R.; KAPPLERA, J. W.; MARRACKA, P. Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. *PNAS.* 7914-7919, 2011.

MAGALHÃES, P. O.; LOPES, A. M.; MAZZOLA, P. G.; RANGEL-YAGUI, C.; PENNA, T. C. V.; PESSOA-JR, A. Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: a Review. **J Pharm Pharmaceut Sci.** 10: 388-404, 2007.

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**. 23:3131-8, 2005.

MIAO, E. A.; ANDERSEN-NISSEN, E.; WARREN, S. E.; ADEREM, A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagelin in innate immune system. **Semin. Immunophatol.**, v.29, n.3, p275-288, 2007.

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. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária / **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**. Brasília, 2005.

MITCHELL, G. H.; THOMAS, A. W.; MARGOS, G.; DLUZEWSKI, A. R.; BANNISTER, L. H. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. **Infect. Immun.** 72:154-8, 2004.

MIYAKI, C.; QUINTILIO, W.; MIYAJI, E. N.; BOTOSSO, V. F.; KUBRUSLY, F. S.; SANTOS, F. L.; IOURTOV, D.; HIGASHI, H. G.; RAW, I. Production of H5N1 (NIBRG-14) inactivated whole virus and split virion influenza vaccines and analysis of immunogenicity in mice using different adjuvant formulations. **Vaccine**. 28: 2505-9, 2010

MONS, B.; CROON, J. J.; VAN DER STAR, W.; VAN DER KAAY, H. J. Erythrocytic schizogony and invasion of *Plasmodium vivax* in vitro. **Int J Parasitol.** 18:307-311, 1988.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Adv Immunol.** 46:111-47, 1989.

MORAIS, C. G., SOARES, I. S., CARVALHO, L. H., FONTES, C. J. F., KRETTLI, A. U., BRAGA, E. M. Antibodies to *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1: Persistence and correlation with Malaria transmission intensity. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 75:582 – 587, 2006.

MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells by apicomplexan parasites. **Microbes Infect.** 3: 1123-8, 2001.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; 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: 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: 1266-73, 2008.

MULLEN, G. E.; ELLIS, R. D.; MIURA, K.; MALKIN, E.; NOLAN, C.; HAY, M.; et. al. Phase 1 trial of AMA1-C1/Alhydrogel plus CPG 7909: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. **PLoS One**. 13, e2940, 2008.

MURATA, K.; GARCIA-SASTRE, A.; TSUJI, M.; RODRIGUES, M.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; NUSSENZWEIG, R. S.; PALESE, P.; ESTEBAN, M.; ZAVALA, F. Characterization of *in vivo* primary and secondary CD8⁺ T cell responses induced by recombinant influenza and vaccinia viruses. **Cel Immunol** 173: 96-107, 1996.

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

NARUM, D. L.; OGUN, S. A.; THOMAS, A. W.; HOLDER, A. A. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. **Infect. Immun.** 68: 2899-906, 2000.

NUSSENZWEIG, V.; NUSSENZWEIG, R. S. Rationale for the development of an engineered sporozoite malaria vaccine. **Adv Immunol** 45: 283-334, 1989.

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.

PIZARRO, J. C.; VULLIEZ-LE NORMAND, B.; CHESNE-SECK, M. L.; COLLINS, C. R.; WITHERS-MARTINEZ, C.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M. J.; FABER, B. W.; REMARQUE, E. J.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BENTLEY, G. A. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science.** 308: 408-11, 2005.

POLLEY, S. D.; CONWAY, D. J. Strong diversifying selection on domains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 gene. **Genetics.** 308: 408-11, 2001.

PRICE, R. N.; TJITRA, E.; GUERRA, C. A.; YEUNG, S.; WHITE, N. J.; ANSTEY, N. M. *Vivax* malaria: neglected and not benign. **Am J Trop Med Hyg.** 77: 79-87, 2007.

QUINTILIO, W.; KUBRUSLY, F. S.; IOURTOV, D.; MIYAKI, C.; SAKAUCHI, M. A.; LÚCIO, F.; DIAS, S. de C.; TAKATA, C. S.; MIYAJI, E. N.; HIGASHI, H. G.; LEITE, L. C.; RAW, I. Bordetella pertussis monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. **Vaccine.** 27:4219-24, 2009.

RAMOS, H. C.; RUMBO, M.; SIRARD, J. C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends Microbiol.** 12: 509-517, 2004.

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

REMARQUE, E. J.; FABER, B. W.; KOCKEN, C. H. M.; THOMAS, A. W. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends Parasitol.** 24: 74-84, 2008.

RESENDE, D. M.; CAETANO, B. C.; DUTRA, M. S.; PENIDO, M. L.; ABRANTES, C. F.; VERLY, R. M.; RESENDE, J. M.; PILÓ-VELOSO, D.; REZENDE, S. A.; BRUNA-ROMERO, O.; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8⁺ T cells. **Vaccine**. 26(35):4585-93, 2008.

REY, L. **Os Plasmódios e a Malária: I. Malária. Parasitologia**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

RIBEIRO, S. P.; ROSA, D. S.; FONSECA, S. G.; MAIRENA, E. C.; POSTO, E.; OLIVEIRA, S. C.; GUILHERME, L. KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Vaccine Encoding Conserved Promiscuous HIV CD4 Epitopes Induces Broad T Cell Responses in Mice Transgenic to Multiple Common HLA Class II Molecules. **Plos One**. 5: e11072, 2010.

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

RILEY, E. M.; WAHL, S.; PERKINS, D. J.; SCHOFIELD, L. Regulating immunity to malaria. **Parasite Immunol** 28: 35-49, 2006.

ROGERS, W. O.; GOWDA, K.; HOFFMAN, S. L. Construction and immunogenicity of DNA vaccine plasmids encoding four *Plasmodium vivax* candidate vaccine antigens. **Vaccine**. 17: 3136-44, 1999.

RODRIGUES, M. M.; CORDEY, A. S.; ARREAZA, G.; CORRADIN, G.; ROMERO, P.; MARYANSKI, J. L.; NUSSENZWEIG, R.S.; ZAVALA, F. CD8⁺ cytolytic T cell clones derived against the *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein protect against malaria. **Int Immunol** 3: 579-585, 1991.

RODRIGUES, M.; LI, S.; MURATA, K.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; BACIK, I.; BENNINK, J. R.; YEWDELL, J. W.; GARCIA-SASTRE, A.; NUSSENZWEIG, R. S.; ESTEBAN, M.; PALESE, P.; ZAVALA, F. Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8⁺ T cell and B cell epitopes. **J Immunol**. 153: 4636-4648, 1994.

RODRIGUES, E. G.; ZAVALA, F.; EICHINGER, D.; WILSON, J. M.; TSUJI, M. Single immunizing dose of recombinant adenovirus efficiently induces CD8⁺ T cell-mediated protective immunity against malaria. **J Immunol** 1268-1274, 1997.

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

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

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: 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-NETO, 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: 2130-7, 2006.

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 transmtion of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in Western Kenya. **Am J Trop Med Hyg.** v. 75 (4): p. 575-581, 2006.

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

SAGARA, I.; ELLIS, R. D.; DICKO, A.; NIAMBELE, M. B.; et. al. A randomized and controlled Phase 1 study of the safety and immunogenicity of the AMA1-C1/Alhydrogel® + CPG 7909 vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria in semi-immune Malian adults. **Vaccine.** 27: 7292 – 98, 2009.

SEDEGAH, M.; KIM, Y.; PETERS, B.; MCGRATH, S.; GANESHAN, H.; LEJANO, J.; ABOT, E.; et al. Identification and localization of minimal MHC-restricted CD8+ T cell epitopes within the *Plasmodium falciparum* AMA1 protein. **Malar J.**, 24; 9:241, 2010.

SILVIE, O.; FRANETICH, J. F.; RÉNIA, L.; MAZIER, D. Malaria sporozoite: migrating for a living **Trends Mol. Med.** 10: 97-100, 2004.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. T. Recent advances in vaccine adjuvants. **Pharm Res.** 19:715-28, 2002.

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.

STOWERS, A. W.; KENNEDY, M. C.; KEEGAN, B. P.; SAUL, A.; LONG, C. A.; MILLER, L. H. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. **Infect. Immun.** 70: 6961-7, 2002.

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.** 313:1287-90, 2006.

SUMIDA, S. M.; TRUITT, D. M.; KISHKO, M. G.; ARTHUR, J. C.; JACKSON, S. S.; GORGONE, D. A.; LIFTON, M. A.; KOUDSTAAL, W.; PAU, M. G.; KOSTENSE, S.; HAVENGA, M. J.; GOUDSMIT, J.; LETVIN, N. L.; BAROUCH, D. H. Neutralizing antibodies and CD8+ T lymphocytes both contribute to immunity to adenovirus serotype 5 vaccine vectors. **J. Virol.** 78:2666–2673, 2004.

The RTS,S Clinical Trials Partnership. A Field Trial to Assess a Blood-Stage Malaria Vaccine. **N Engl J Med.** 365:1004-1013, 2011.

THERA, M. A.; DOUMBO, O. K.; COULIBALY, D.; LAURENS, M.B.; OUATTARA, A.; KONE, A. K.; GUINDO, A. B.; TRAORE, K.; TRAORE, I.; KOURIBA, B.; DIALLO, D. A.; DIARRA, I.; DAOU, M.; DOLO, A.; TOLO, Y.; SISSOKO, M. S.; NIANGALY, A.; SISSOKO, M.; TAKALA-HARRISON, S.; LYKE, K. E.; WU, Y.; BLACKWELDER, W. C.; GODEAUX, O.; VEKEMANS, J.; DUBOIS, M. C.; BALLOU, W. R.; COHEN, J.; THOMPSON, D.; DUBE, T.; SOISSON, L.; DIGGS, C. L.; HOUSE, B.; LANAR, D. E.; DUTTA, S.; HEPPNER, D. G. JR, PLOWE, C. V. A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. **N Engl J Med.** 365: 1004-13, 2011.

THOMAS, A. W., DEANS, J. A., MITCHELL, G. H., ALDERSON, T., COHEN, S. The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 13: 187-99, 1984.

THOMAS, A. W., NARUM, D.; WATERS, A. P.; TRAPE, J. F.; ROGIER, C.; GONÇALVES, A.; ROSARIO, V.; DRUILHE, G. H.; MITCHELL, G. H.; DENNIS, D. Aspects of immunity for the AMA-1 family of molecules in humans and non-human primates malarias. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 89: 67-70, 1994.

TONKIN, M. L.; ROQUES, M.; LAMARQUE, M. H.; PUGNIERE, M.; DOUGUET, D.; CRAWFORD, J.; LEBRUN, M.; BOULANGER, M. J. Host Cell Invasion by Apicomplexan Parasites: Insights from the Co-Structure of AMA1 with a RON2 Peptide. **SCIENCE.** 333: 463 – 67, 2011.

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

TUTEJA, R. Malaria – an overview. **Febs J.** 274: 4670-9, 2007.

URQUIZA, M.; SUAREZ, J. E.; CARDENAS, C.; LOPEZ, R.; PUENTES, A.; CHAVEZ, F.; CALVO, J. C.; PATARROYO, M. E. *Plasmodium falciparum* AMA-1 erythrocyte binding peptides implicate AMA-1 as erythrocyte binding protein. **Vaccine**. 19: 508-13, 2000.

WATERS, A. P.; THOMAS, A. W.; DEANS, J. A.; MITCHELL, G. H.; HUDSON, D. E.; MILLER, L. H.; MCCUTCHAN, T. F.; COHEN, S. A merozoite receptor protein from *Plasmodium knowlesi* is highly conserved and distributed throughout *Plasmodium*. **J. Biol. Chem.** 265: 17974-9, 1990.

WICKRAMARACHCHI, T.; CABRERA, A. L.; SINHA, D.; DHAWAN, S.; CHANDRAN, T.; DEVI, Y. S.; KONO, M.; SPIELMANN, T.; GILBERGER, T. W.; CHAUHAN, V. S.; MOHMMED, A. A novel *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding protein associated with the merozoite surface, PfDBLMSP. **Int J Parasitol.** 39: 763-73, 2009.

World Health Organization – WHO – 2005. Update on development of vaccines against *Plasmodium vivax* malaria. <http://www.who.int/vaccines-documents>. (Acessado em 12/09/2010).

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

A.1. Alinhamento múltiplo Clustal W das seqüências de nucleotídeos de *Pvama-1* previamente descrita e da seqüência otimizada para expressão em leveduras.

		10		20	
1	- - - - -	C	C T A C C G T T G A		A.seq
1	G C G G C C G C G	C	C A A C A G T T G A		B.seq
		30		40	
12	G A G A A G C A C	A C G A A T G A G T A		A.seq	
21	G A G A A G T A C	T A G A A T G T C C A		B.seq	
		50		60	
32	A C C C C T G G A A A G C G T T C A T G			A.seq	
41	A T C C C C T G G A A A G G C C T T T A T G			B.seq	
		70		80	
52	G A A A A T A C G A C A T C G A A A A			A.seq	
61	G A G A A G T A C G A C A T T G A A A A			B.seq	
		90		100	
72	A A C A C A C A G T T C T G G G G T T C			A.seq	
81	G A C T C A C T C A T C C G G A G T T A			B.seq	
		110		120	
92	G A G T G G A T T T A G G G G A A G A T			A.seq	
101	G A G T T G A C T T G G G A G A A G A T			B.seq	
		130		140	
112	G C A G A A G T G G A A A A T G C A A A			A.seq	
121	G C C G A G G T C G A A A A T G C A A A			B.seq	
		150		160	
132	G T A C A G A A T T T C C A G C T G G A A			A.seq	
141	G T A C C G T A T T C C C G C T G G A A			B.seq	
		170		180	
152	G A T G T C C T G T T T T G G A A A G			A.seq	
161	G A T G T C C C G T C T T C G G A A A G			B.seq	
		190		200	
172	G G T A T C G T C A T A G A G A A T T C			A.seq	
181	G G A A T A G T T A T C G A G A A C A G			B.seq	
		210		220	
192	C G C T G T T A G C T T C T T A A C C C			A.seq	
201	C G C A G T G A G T T T C T G A C A C			B.seq	
		230		240	
212	C T G T G G C T A C A G G A G A T C A G			A.seq	
221	C T G T T G C A A C T G G A G A C C A G			B.seq	
		230		240	
212	C T G T G G C T A C A G G A G A T C A G			A.seq	
221	C T G T T G C A A C T G G A G A C C A G			B.seq	
		250		260	
232	A G G C T G A A G G A T G G A G G T T T			A.seq	
241	A G A C T A A A A G A T G G T G G T T T			B.seq	

	270	280	
252	C G C C T T C C C C A A T G C G A A T G	A.seq	
261	C G C A T T T C C C A A A T G C C A A T G	B.seq	
	290	300	
272	A C C A T A T C T C C C C C A T G A C A	A.seq	
281	A T C A C A T T T C T C C T A T G A C C	B.seq	
	310	320	
292	A T A G C G A A C C T T A A G G C A A G	A.seq	
301	A T T G C A A A C C C T T A A G G C T A G	B.seq	
	330	340	
312	G T A T A A A G A C A A T G T A G A G A	A.seq	
321	A T A T A A G G A C A A T G T T G A A A	B.seq	
	350	360	
332	T G A T G A A G T T A A A C G A T A T A	A.seq	
341	T G A T G A A G T T G A A C G A C A T T	B.seq	
	370	380	
352	G C T T T G T G C A G A A C C C A C G C	A.seq	
361	G C T T T A T G C C C G T A C C C A T G C	B.seq	
	390	400	
372	A G C T A G C T T T T G T C A T G G C A G	A.seq	
381	A G C T T C C T T T G T C A T G G C T G	B.seq	
	410	420	
392	G G G A T C A A A A T T C G T C C T A C	A.seq	
401	G T G A C C A A A A C A G C A A C T A T	B.seq	
	430	440	
412	A G A C A C C C A G C T G T A T A C G A	A.seq	
421	A G A C A T C C A G C C G T A T A C G A	B.seq	
	450	460	
432	C G A A A A G G A A A A A C A T G C C	A.seq	
441	T G A A A A G G A A A A A G A C T T G T C	B.seq	
	470	480	
452	A C A T G T T G T A T T T A T C A G C G	A.seq	
461	A C A T G T T G T A T C T T T C A G C C	B.seq	
	490	500	
472	C A G G A A A A T A T G G G T C C G A G	A.seq	
481	C A G G A A A A T A T G G G T C C T A G	B.seq	
	510	520	
492	G T A C T G C A G C C C A G A T G C A C	A.seq	
501	A T A T T G C T C C C C A G A C G C T C	B.seq	

	530	540	
512	A A A A T A G A G A T G C C G T G T T C	A.seq	
521	A G A A T C G T G A C G C T G T T T C	B.seq	
	550	560	
532	T G C T T T C A A G C C A G A T A A A A A	A.seq	
541	T G C T T T A A A C C A G A C A A A A G A	B.seq	
	570	580	
552	T G A A A G C T T T T G A A A A C C T G G	A.seq	
561	C G A A A G T T T T G A A A A T C T A G	B.seq	
	590	600	
572	T G T A T T T T G A G C A A A A T G T G	A.seq	
581	T C T A C C T T A G C A A A A A T G T G	B.seq	
	610	620	
592	C G T A A T G A T T T G G G A T A A A A A	A.seq	
601	A G G A A T G A T T T G G G A C A A G A A	B.seq	
	630	640	
612	A T G C C C C C G T A A A A A T T T A G	A.seq	
621	G T G T C C A A G A A A G A A C T T G G	B.seq	
	650	660	
632	G A A A C G C C A A A G T T T C G G A T T A	A.seq	
641	G A A A C G C T A A A G T T T G G C T T G	B.seq	
	670	680	
652	T G G G T G G A T G G G A A A C T G C G A	A.seq	
661	T G G G T A G A T G G A A A C T G T G A	B.seq	
	690	700	
672	A G A A A T T C C A T A C G T T A A A G	A.seq	
681	A G A G A T T C C A T A C G T T A A A G	B.seq	
	710	720	
692	A A G T G G A G G C A A A G G A T C T G	A.seq	
701	A A G T T G A A G C T A A A G A C C T A	B.seq	
	730	740	
712	C G C G A A T G C A A C C G A A T C G T	A.seq	
721	C G T G A G T G T A A C A G G A T T G T	B.seq	
	750	760	
732	T T T C G A A G C G A G T G C C T C A G	A.seq	
741	T T T C G A A G C T T C T G C A T C C G	B.seq	
	770	780	
752	A T C A A C C A A C T C A G T A T G A A	A.seq	
761	A C C A A C C C A C C C A G T A C G A G	B.seq	

	790	800	
772	G A A G A A A T G A C G G A T T A T C A	A.seq	
781	G A A G A A A T G A C T G A T T A T C A	B.seq	
	810	820	
792	A A A A A T A C A A C A A G G G T T T A	A.seq	
801	A A A G A T T C A A C A A G G T T T T A	B.seq	
	830	840	
812	G A C C A A A A C A A C G G A G A G A T G	A.seq	
821	G A C C A A A A T A A T A G G G A A A T G	B.seq	
	850	860	
832	A T T T A A A A G T G C C T T T T C T T C C	A.seq	
841	A T T A A A A T C C G C C T T T T T G C C	B.seq	
	870	880	
852	A G T G G G T G C A T T T C A A C T C G G	A.seq	
861	A G T T G G T G C T T T T A A C T C C G	B.seq	
	890	900	
872	A T A A T T T C A A A A G T A A A G G A	A.seq	
881	A T A A T T T C A A G A G C A A A G G A	B.seq	
	910	920	
892	A G A G G A T T T A A C T T G G G C A A A	A.seq	
901	A G A G G T T T T A A C T G G G C T A A	B.seq	
	930	940	
912	T T T C G A T T T C T G T A A A A A A G A	A.seq	
921	T T T T G A T T C C G T A A A G A A A A	B.seq	
	950	960	
932	A G T G T T A C A T C T T T T A A T A C C	A.seq	
941	A G T G T T A T A T T T T A A C A C C A	B.seq	
	970	980	
952	A A A C C G A C T T T G C C T C A T T A A	A.seq	
961	A A A C C T A C A T G C T T G A T T A A	B.seq	
	990	1000	
972	T G A C A A A A A T T T T A T T G C A A	A.seq	
981	T G A C A A A A A T T T T A T C G C T A	B.seq	
	1010	1020	
992	C A A C G G C G T T A T C T C A C C C C A	A.seq	
1001	C C A C T G C T C T T T C A C A C C C T	B.seq	
	1030	1040	
1012	C A A G A A G T A G G C C C G G A G T T	A.seq	
1021	C A A G A A G T T G G A C C A G A A T T	B.seq	

	1050	1060	
1032	C C C C T G C A G C A T A T A T A A A G	A.seq	
1041	T C C C T T G T T C T A T A T A T A A G G	B.seq	
	1070	1080	
1052	A C G A A A T T G A A A G A G A A A T T	A.seq	
1061	A T G A A A T T G A G A G A G A A A T C	B.seq	
	1090	1100	
1072	A A G A A A C A A T C G A G G A A C A T	A.seq	
1081	A A A A A G C A G A G T A G A A A C A T	B.seq	
	1110	1120	
1092	G A A T C T G T A C A G T G T T G A T G	A.seq	
1101	G A A T C T G T A C T C A G T G G A C G	B.seq	
	1130	1140	
1112	G G G A A C G C A T T G T C C C T G C C G	A.seq	
1121	G T G A G A G A A T T G T G T T A C C C	B.seq	
	1150	1160	
1132	A G G A T A T T T A T C T C C A A C G A	A.seq	
1141	C G T A T C T T C A T C T C A A A T G A	B.seq	
	1170	1180	
1152	T A A G G A G A G T A T C A A A T G T C	A.seq	
1161	T A A A G A G T C C A T T A A G T G T C	B.seq	
	1190	1200	
1172	C C T G C G A A C C T G A G C G C A T T	A.seq	
1181	C T T G T G A A C C A G A A C G T A T T	B.seq	
	1210	1220	
1192	T C C A A C A G T A C C T G C A A C T T	A.seq	
1201	T C T C A G T C T A C C T G T A A C T T	B.seq	
	1230	1240	
1212	T T A C G T T T G T A A C T G T G T A G	A.seq	
1221	T T A C G T T T G T A A C T G C G T T G	B.seq	
	1250	1260	
1232	A G A A A A G G G C G G A A A T T A A G	A.seq	
1241	A G A A G A G A G C T G A G A T T A A A	B.seq	
	1270	1280	
1252	G A A A A T A A C C A A G T T G T T A T	A.seq	
1261	G A G A A T A A T C A A G T T G T G A T	B.seq	
	1290	1300	
1272	A A A G G A A G A A T T T A G G G A T T	A.seq	
1281	T A A A G A A G A G T T T A G A G A C T	B.seq

A. Sequência de nucleotídeos do gene *PvAMA-1* (Rodrigues et al., 2005)

B. Sequência de nucleotídeos do gene otimizado, destacando as regiões de consenso e potenciais sítios de glicosilação removidos. Em cinza encontra-se a similaridade entre os genes, em azul a sequência correspondente a His-tag inserida e em lilás sítios para a enzima de restrição *NotI*. Os potenciais sítios de glicosilação removidos estão destacados em rosa.

A.2. Alinhamento múltiplo Clustal W das seqüências de aminoácidos de *Pvama-1* descrita e da seqüência modificada para expressão em leveduras.

		10	20	
1	- - - P T V E R S T R M S N P W K A F M			A.pro
1	A A A P T V E R S T R M S N P W K A F M			B.pro
		30	40	
18	E K Y D I E K T H S S G V R V D L G E D			A.pro
21	E K Y D I E K T H S S G V R V D L G E D			B.pro
		50	60	
38	A E V E N A K Y R I P A G R C P V F G K			A.pro
41	A E V E N A K Y R I P A G R C P V F G K			B.pro
		70	80	
58	G I V I E N S A V S F L T P V A T G D Q			A.pro
61	G I V I E N S A V S F L T P V A T G D Q			B.pro
		90	100	
78	R L K D G G F A F P N A N D H I S P M T			A.pro
81	R L K D G G F A F P N A N D H I S P M T			B.pro
		110	120	
98	I A N L K A R Y K D N V E M M K L N D I			A.pro
101	I A N L K A R Y K D N V E M M K L N D I			B.pro
		130	140	
118	A L C R T H A A S F V M A G D Q N S S Y			A.pro
121	A L C R T H A A S F V M A G D Q N S N Y			B.pro
		150	160	
138	R H P A V Y D E K E K T C H M L Y L S A			A.pro
141	R H P A V Y D E K E K T C H M L Y L S A			B.pro
		170	180	
158	Q E N M G P R Y C S P D A Q N R D A V F			A.pro
161	Q E N M G P R Y C S P D A Q N R D A V F			B.pro
		190	200	
178	C F K P D K N E S F E N L V Y L S K N V			A.pro
181	C F K P D K D E S F E N L V Y L S K N V			B.pro
		210	220	
198	R N D W D K K C P R K N L G N A K F G L			A.pro
201	R N D W D K K C P R K N L G N A K F G L			B.pro
		230	240	
218	W V D G N C E E I P Y V K E V E A K D L			A.pro
221	W V D G N C E E I P Y V K E V E A K D L			B.pro
		250	260	
238	R E C N R I V F E A S A S D Q P T Q Y E			A.pro
241	R E C N R I V F E A S A S D Q P T Q Y E			B.pro

		270		280	
258	E E M T D Y Q K I	Q Q G F R Q N N R E M	A.pro		
261	E E M T D Y Q K I	Q Q G F R Q N N R E M	B.pro		
		290		300	
278	I K S A F L P V G A F N S D N F K S K G	A.pro			
281	I K S A F L P V G A F N S D N F K S K G	B.pro			
		310		320	
298	R G F N W A N F D S V K K K C Y I F N T	A.pro			
301	R G F N W A N F D S V K K K C Y I F N T	B.pro			
		330		340	
318	K P T C L I N D K N F I A T T A L S H P	A.pro			
321	K P T C L I N D K N F I A T T A L S H P	B.pro			
		350		360	
338	Q E V G P E F P C S I Y K D E I E R E I	A.pro			
341	Q E V G P E F P C S I Y K D E I E R E I	B.pro			
		370		380	
358	K K Q S R N M N L Y S V D G E R I V L P	A.pro			
361	K K Q S R N M N L Y S V D G E R I V L P	B.pro			
		390		400	
378	R I F I S N D K E S I K C P C E P E R I	A.pro			
381	R I F I S N D K E S I K C P C E P E R I	B.pro			
		390		400	
378	R I F I S N D K E S I K C P C E P E R I	A.pro			
381	R I F I S N D K E S I K C P C E P E R I	B.pro			
		410		420	
398	S N S T C N F Y V C N C V E K R A E I K	A.pro			
401	S Q S T C N F Y V C N C V E K R A E I K	B.pro			
		430		440	
418	E N N Q V V I K E E F R D Y Y E N G E E	A.pro			
421	E N N Q V V I K E E F R D Y Y E N G E E	B.pro			
		450			
438	K S N K Q M L L	A.pro			
441	K S N K Q M L L H H H H H H A A A	B.pro			

A. Sequência de aminoácidos do gene *PvAMA-1* (Rodrigues et al., 2005)

B. Sequência de aminoácidos do gene otimizado, destacando as alterações que ocorreram após a eliminação dos potenciais sítios de glicosilação anteriormente identificados. As modificações em aminoácidos não representaram alteração nas propriedades físico-químicas da proteína que estão também relacionadas a sua conformação, já que S e N são polares e não apresentam carga no grupo radicalar e N, D e Q são aminoácidos com grupamentos laterais hidrofílicos.