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

Avaliação da imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas em antígenos de diferentes estágios do *Plasmodium vivax* expressos em *Pichia pastoris*

Luciana Chagas de Lima

Versão Corrigida

Tese para obtenção do grau de DOUTOR.

Orientadora:

Profa. Dra. Irene da Silva Soares.

São Paulo

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas

Avaliação da imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas em antígenos de diferentes estágios do *Plasmodium vivax* expressos em *Pichia pastoris*

Luciana Chagas de Lima

Versão Corrigida

Tese para obtenção do grau de DOUTOR.

Orientadora:

Profa. Dra. Irene da Silva Soares.

São Paulo 2014

Ficha Catalográfica

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

Lima, Luciana Chagas de

L732a Avaliação da imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas em antígenos de diferentes estágios do *Plasmodium vivax* expressos em *Pichia pastoris* / Luciana Chagas de Lima. -- São Paulo, 2014.

138p.

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

Orientador: Soares, Irene da Silva

1. Imunologia: Plasmodium vivax 2. Vacina: Farmacologia 3. Malária 4. Proteínas recombinantes 5. Antígenos I. T. II. Soares, Irene da Silva, orientador.

616.9362079 CDD

Luciana Chagas de Lima

Avaliação da imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas em antígenos de diferentes estágios do *Plasmodium vivax* expressos em *Pichia pastoris*

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor.

Profa. Dra. Irene da Silva Soares orientadora/presidente

Prof. Dr. Oscar Bruna Romero

1° examinador

Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa

2º examinador

Profa. Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira

3° examinador

Prof. Dr. Gerhard Wunderlich

4º examinador

A minha mãe, pela pessoa indescritivelmente especial que ela é. Por ser meu exemplo de bondade, força, determinação, competência e confiança. Por seu amor incondicional, apoio constante, incentivo e principalmente pela compreensão em todos os momentos difíceis. Eu amo você.

A minha avó Juliana, minha tia (Rosimeire Juliana) e ao meu irmão (Francisco) pelo carinho, apoio e pela amizade. Mesmo não dizendo com frequência, eu amo vocês.

Ao meu avô José Patrício (in memoriam). A pessoa que mais fez questão de mostrar seu amor por mim. Lembrar-me de você dói, mas nunca vou poder ou desejar te esquecer.

A Elaine Vicentin, Kátia Sanches Françoso e Amanda Bittencourt, pela amizade sincera construída, por toda a ajuda e por nunca me deixarem desistir. Vocês são muito mais que amigas, foram mães e irmãs. São exemplos de persistência, fidelidade competência, eu não poderia ter tido melhores companheiras. Ao Denis e William pela amizade, caronas, risadas e conversas.

Aos meus amigos, pós-graduandos ou não.

Principalmente a Dimitrius Oliveira e Paula Vieira, pelo seu amor. companhia e apoio. A Karen Watanabe e Luciana Deliza, por serem minhas irmãs de coração, companheiras de lágrimas gargalhadas. A Ronan Silva, Caio Silva, Ana Laura Azevedo, Marilia Dezem, Luciana Takahashi, Jonas Soares e Thiago Margues, por acreditarem que sonhos podem sim se tornar realidade.

A Renata Albuquerque, Patrícia Casale, Patrícia Silva, Lais Teixeira, Marcela Cavalcante, Jaqueline Cavalcante, Nathália Monteiro, Eduardo Balciunas, Jaqueline Beltran, Graziela Batista e Dalila Cunha, por dividirem as angústias da Pós-Graduação.

O companheirismo, o carinho, a confiança e a paciência de vocês foram essenciais.

E a tudo e todos que me fizeram acreditar que sonhos são realizáveis.

Seja "Carpe-diem" ou "Hakuna Matata", felicidade é importante e necessária para alcançar nossos sonhos.

Muito obrigada a todos que contribuem e contribuíram com os momentos em que, sem sombras de dúvida, eu me considerei feliz!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Irene da Silva Soares, pela oportunidade de realização desta tese e por sua contribuição na minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Maurício Martins Rodrigues, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia/CTCMol da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) pela cessão dos plasmídeos da proteína circunsporozoíta e outros reagentes e pela utilização de seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

À Dra. Isabel de Fátima Correia Batista e ao Dr. Rafael Marques Porto, do Instituto Butantan pela análise das proteínas recombinantes por RP-HPLC.

À Profa. Cristiane Gozzo, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP) pela contribuição na análise dos dados de espectroscopia.

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado do Laboratório em Pesquisa Básica de Malária do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS pela acolhida, orientação e treinamento na técnica de imunofluorescência, durante estágio realizado em Belém (PA).

Ao IPEN/CNEN/SP, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo e aos seus engenheiros pela utilização do irradiador de cobalto-60 modelo GammaCell-220.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de doutorado direto e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), pela oportunidade de realização do curso de Doutorado direto.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP e seus funcionários das secretarias, laboratórios e suporte, destacando as secretárias Ana Maria Dias Dantas e Edna Batista Lima. Obrigada pela disposição em ajudar e pelas orientações.

Aos professores Rosario Dominguez Crespo Hirata, Gerhard Wunderlich e Gisele Monteiro de Souza pelas sugestões e direcionamentos no momento da qualificação.

Aos demais professores e seus orientandos que compõem o Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela cessão da utilização de equipamentos e disponibilidade para discussões.

Ao biotério do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo (IQ/USP) e suas funcionárias, por colocar à disposição sua área experimental necessária para a realização dos estudos pré-clínicos.

À doutora Laís Helena Teixeira, do Departamento de Microbiologia do ICB/USP, pela cessão de materiais e contribuição experimental neste trabalho, durante seu doutorado no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP.

Ao doutorando Jonatan Ersching do Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia/CTCMol da UNIFESP pelo treinamento na técnica de ELISPOT.

À doutora Elaine Cristina Matos Vicentin, do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, por toda a contribuição dada neste trabalho, principalmente no treinamento nas técnicas de obtenção e purificação de proteínas, imunizações experimentais, ELISA e CFSE.

À mestre e técnica do Laboratório de Parasitologia da FCF/USP Kátia Sanches Françoso, por toda a contribuição dada neste trabalho, principalmente nos ensaios celulares.

À mestre Patrícia A. O. C. Valado pelo treinamento nos ensaios celulares de CFSE e ELISPOT.

À mestre e técnica de citometria do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Renata Albuquerque por todo o suporte, apoio e orientação na realização dos ensaios celulares e operação do citômetro FACSCantoII™.

As ex-alunas do Laboratório de Parasitologia da FCF/USP, Victória Simão, Mayne Pereira, Tatiana Dagli, Mariana Vilela e Camila Romano, muito obrigada, pela companhia diária, pelas conversas, conselhos, ajuda, lágrimas e risadas. Os dias foram melhores por vocês estarem ao meu lado, sem nenhuma dúvida.

Aos professores Oscar Bruna Romero, Fábio Trindade Maranhão Costa, Maria Leonor Sarno de Oliveira e Gerhard Wunderlich por comporem minha banca de defesa e pelas contribuições para melhoria desta tese.

Aos meus padrinhos Edilson de Almeida Lima, Taciana Tribis de Almeida Lima e seus filhos Fábio e Kátia pelo carinho, cuidados e apoio que sempre recebi.

Ao meu padrasto Juan C. Messano pelo apoio e carinho dos últimos anos.

Ao meu pai Francisco C. Lima Filho por ter incentivado meus estudos enquanto esteve por perto.

"Say goodbye to gravity and say goodbye to death.

Hello to eternity and live for every breath. Your time will come".

Adrian Smith, Bruce Dickinson e Steve Harris.

(Iron Maiden)

RESUMO

LIMA, L. C. Avaliação da imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas em antígenos de diferentes estágios do *Plasmodium vivax* expressos em *Pichia pastoris*. 2014. 138 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

O Plasmodium vivax é a espécie causadora de malária de maior distribuição mundial e maior prevalência nas Américas. A complexidade do ciclo de vida do parasito e sua extensa diversidade antigênica têm dificultado a obtenção de uma vacina eficaz e inferem que seja pouco provável que este objetivo seja alcançado utilizando um único antígeno. Neste contexto, a combinação de regiões imunodominantes de antígenos de um ou mais estágios do ciclo de vida do Plasmodium pode ser uma estratégia com melhor prognóstico na indução de resposta imune protetora e duradoura contra a atividade parasitária. Este trabalho avaliou a imunogenicidade, em camundongos, de uma formulação vacinal composta pela mistura dos antígenos CSP, pré-eritrocítico e AMA-1, o qual é expresso em ambos os estágios, préeritrocítico e eritrocítico assexuado. A proteína quimérica yPvCSAll_{FL}, que contém epítopos para células B da região central (repeats) das 3 variantes alélicas PvCSP-VK210, PvCSP-VK247 e PvCSP-P. vivax-like fusionados, e a yPvAMA-1 foram expressas com sucesso em leveduras Pichia pastoris e purificadas por métodos cromatográficos para a imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6, na presença do adjuvante Poly(I:C), agonista de TLR3. Por ELISA, foram determinados os títulos de anticorpos, as subclasses de IgG e a avidez destes pelas proteínas indutoras, administradas isoladamente ou em combinação. A resposta de anticorpos anti-yPvCSAll_{FL} mostrou ser linhagem dependente, tendo sido observado altos títulos de anticorpos IgG (10⁶) em C57BL/6, os quais se mantiveram elevados por até 6 meses após a última dose. Os anticorpos anti-yPvCSAll_{FL}, predominantemente IgG1, foram capazes de reconhecer proteínas representando as 3 variantes alélicas. No geral, a coadministração dos antígenos yPvCSAll_{FL} e yPvAMA-1 não comprometeu a resposta de anticorpos individual. Utilizando este protocolo de vacinação não foi possível detectar resposta proliferativa de células TCD3⁺TCD4⁺ ou TCD3⁺TCD8⁺ específicas após a estimulação com yPvCSAll_{FL}. Os índices de proliferação (8,31%) e o padrão de secreção das citocinas IFN-γ, IL-2, TNF-α e IL-10, associados à yPvAMA-1, sofreram redução com a coadministração de antígenos (6.33%) e alteração, com elevação de IL-2 em detrimento das demais citocinas. Os dados gerados no estudo das formulações vacinais apresentadas neste trabalho podem ser úteis para o desenvolvimento de uma vacina anti-P. vivax, principalmente por explorarem estratégias de combinação e fusão de antígenos.

Palavras-chave: Vacina; *Plasmodium vivax*; *Pichia pastoris*; proteína recombinante.

ABSTRACT

LIMA, L. C. Immunogenic evaluation of recombinant proteins expressed in *Pichia pastoris* based on *Plasmodium vivax* antigens from different parasite stages. 2014. 138 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.

Plasmodium vivax is the species of malaria more widely distributed worldwide and with higher prevalence in the Americas. The complexity of the parasite life cycle and its extensive antigenic diversity have hampered the achievement of an effective vaccine and infer that it is unlikely that this goal will be achieved using a single antigen. In this context, the combination of immunodominant regions of antigens of one or more stages of the Plasmodium life cycle can be a strategy with better prognosis at inducing protective and durable immune responses against this parasite. Our study assessed the immunogenicity of vaccine formulations consisting of mixture of antigens CSP, pre-erythrocytic and AMA-1, which is expressed in the both stages, pre-erythrocytic and erythrocytic asexual, in mice. The chimeric protein yPvCSAll_{FL}, which contains B-cell epitopes of the central region (repeats) of the 3 allelic variants PvCSP-VK210, PvCSP-VK247 and PvCSP-P. vivax-like fused, and the yPvAMA-1 were successfully expressed in the yeast Pichia pastoris and purified by chromatographic methods for immunization of BALB/c and C57BL/6 mice in the presence of the adjuvant Poly(I:C), a TLR3 agonist. By ELISA, we determined the titles, IgG subclasses and the avidity of the antibodies to these proteins, administered alone or in combination. The immune response to yPvCSAll_{FL} proved to be dependent on mouse strain, having been observed high titers of IgG antibodies (10⁶) in C57BL/6, which remained high for up to 6 months after the last dose. AntiyPvCSAll_{Fl} antibodies, predominantly IgG1, were able to recognize proteins representing the 3 allelic variants. In general, the co-administration of yPvCSAll_{FL} and yPvAMA-1 antigens did not compromise the individual antibodies response. Using this vaccination protocol, we could not detect cell specific proliferative responses of TCD3⁺TCD4⁺ or TCD3⁺TCD8⁺ after stimulation with vPvCSAll_{Fl}. The proliferation (8.31%) and the pattern of secretion of cytokines IFN- γ , IL-2, TNF- α and IL-10, associated with the yPvAMA-1, were reduced during the co-administration (6.33%) and compensated by the elevation of IL-2. The data generated on the study of vaccine formulations presented in this thesis may be useful for the development of a vaccine anti-P. vivax, mainly by exploiting strategies of combination and fusion of antigens.

Keywords: Vaccine; *Plasmodium vivax*; *Pichia pastoris*; recombinant protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Países, áreas de risco e ocorrência de transmissão de malária	2
Figura 2 -	Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro vertebrado	6
Figura 3 -	Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no mosquito vetor	7
Figura 4 -	Situação atual do controle da malária no mundo	8
Figura 5 - Figura 6 -	Representação esquemática da Proteína CS de <i>Plasmodium</i> Representação esquemática da proteína AMA-1 de <i>Plasmodium</i> e	13
	estrutura cristal de PvAMA-1	17 27
Figura 7 - Figura 8 -	Sequência de aminoácidos de yPvCSAll _{FL}	28
Figura 9 -	Representação esquemática da fase de leitura aberta das sequências das variantes alélicas de <i>Pv</i> CSP presentes no vetor pET-28a para expressão em bactérias <i>E. coli</i>	37
Figura 10 -	Representação esquemática da fase de leitura aberta das sequências de <i>repeats</i> das variantes alélicas de <i>Pv</i> CSP fusionados a flagelina FliC presentes no vetor pET-28a para expressão em bactérias <i>E. coli</i>	39
Figura 11 -	Representação esquemática da vacinação, coleta de sangue e análise da longevidade de anticorpos IgG induzidos	41
Figura 12 -	A proteína recombinante quimérica yPvCSAll _{FL} é expressa de forma solúvel em <i>P. pastoris</i> , após 24 horas de indução, com padrão de migração em 54 kDa preservando os 3 epítopos e a cauda de hexa-histidina	51
Figura 13 -	Os cromatogramas com picos únicos majoritários permitem identificar a proteína recombinante yPvCSAll _{FL} sem produtos de degradação e elevado rendimento, confirmando a pureza final da proteína recombinante	52
Figura 14 -	A proteína recombinante yPvAMA-1 expressa em <i>P. pastoris</i> possui padrão de migração em 53 kDa e é reconhecida por anticorpos monoclonais específicos	54
Figura 15 -	As proteínas recombinantes yPvCSAll _{FL} e yPvAMA-1 apresentam predomínio de fitas β, porém apenas o espectro DC de yPvAMA-1 corresponde ao de uma proteína enovelada	55
Figura 16 -	A proteína recombinante y <i>Pv</i> CSAll _{FL} foi caracterizada como estável a períodos prolongados sem refrigeração, ao contrário de y <i>Pv</i> AMA-1	56
Figura 17 -	As sequências de cada uma das bPvCSP foram reconhecidas de forma específica confirmando a expressão íntegra das proteínas recombinantes de bPvCSP-VK210, bPvCSP-VK247, bPvCSP-P. vivax-like e bPvCSP-All.	
	VIVAX-IING G DF VOOF-AII	58

Figura 18 -	A imunogenicidade da proteína quimérica y <i>Pv</i> CSAll _{FL} é linhagem- dependente	61
Figura 19 -	A proteína quimérica y <i>Pv</i> CSAll _{FL} induz resposta de anticorpos polarizada para Th2 em camundongos C57BL/6	62
Figura 20 -	Os anticorpos anti-y <i>Pv</i> CSAll _{FL} reconhecem as diferentes variantes alélicas de <i>Pv</i> CSP com predomínio dos <i>repeats</i> de VK210 e <i>P.</i>	0.4
Figura 21 -	<i>vivax-like</i> Os anticorpos anti-y <i>Pv</i> CSAll _{FL} induzidos permanecem elevados e inalterados mesmo depois de decorridos 165 dias da última dose	64
	da vacina	66
Figura 22 -	Os anticorpos induzidos pela proteína recombinante quimérica obtida pelo sistema de expressão bacteriano possuem maior	
	avidez por sua proteína indutora	68
Figura 23 -	Estratégia de <i>gates</i> utilizada para segmentar as populações celulares e permitir a análise da proliferação de células TCD3 ⁺ de camundongos C57BL/6 imunizados com as proteínas recombinantes y <i>Pv</i> isoladamente ou em combinação	69
Figura 24 -	A proteína recombinante y <i>Pv</i> AMA-1 foi capaz de induzir, especificamente, a proliferação de células TCD3 ⁺ TCD4 ⁺ e TCD3 ⁺ TCD8 ⁺	70
Figura 25 -	A proteína recombinante yPvAMA-1 foi capaz de induzir,	. •
	especificamente, a secreção de IFN-γ	72
Figura 26 -	A secreção de IFN- γ , IL-4, TNF- α e IL-10 foram associadas ao estímulo com y Pv AMA-1 em citometria de fluxo utilizando o kit	
	Th1/Th2/Th17 de CBA	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição dos grupos animais submetidos às imunizações	
	experimentais	41
Tabela 2 -	Fluorocromos utilizados nos experimentos de citometria de fluxo	46
Tabela 3 -	Análise comparativa das porcentagens de avidez dos anticorpos	
	anti-bPvCSP-All e anti-yPvCSAll _{FL} por suas proteínas	
	recombinantes indutoras	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO
1.1	Aspectos epidemiológicos da malária
1.2	Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> sp
1.3	Estratégias de controle da malária
1.4	Antígenos alvos
1.4.1	Proteína Circunsporozoíta (CSP)
1.4.2	Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1)
1.5 1.6	Coadministração de antígenos e uso de proteínas quiméricas Adjuvante ácido poli-inosínico-poli-citidídilico
2	OBJETIVOS
2.1	Objetivo geral
2.1.1	Objetivos específicos
3	MATERIAIS E MÉTODOS
3.1	Obtenção e caracterização das proteínas expressas em leveduras P. pastoris (yPv)
3.1.1	Proteína Circunsporozoíta quimérica (yPvCSAll _{FL})
3.1.1.1	Gene sintético de y <i>Pv</i> CSAll _{FL}
3.1.1.2	Obtenção e seleção dos clones transformantes de yPvCSAll _{FL}
3.1.1.3	Estabelecimento das condições de expressão e purificação de yPvCSAll _{FL}
3.1.2	Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1)
3.1.3	Caracterização biofísica e bioquímica das proteínas yPv
3.1.3.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)
3.1.3.2	Immunoblotting
3.1.3.3	Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) das y <i>Pv</i>
3.1.3.4	Espectroscopia das yPv
3.1.3.5	Análise de estabilidade das proteínas yPv
3.2	Obtenção e caracterização das proteínas expressas em bactérias E. coli (bPv)
3.2.1	Variantes alélicas de PvCSP
3.2.1.1	Gene sintético das b <i>Pv</i> CSP
3.2.1.2	Expressão e purificação das bPvCSP
3.2.2	Repeats das variantes alélicas individuais de PvCSP fusionados
	a flagelina FliC de Salmonela entérica serovar Thyphimurim
3.3	Análise da imunogenicidade em camundongos
3.3.1	Animais
3.3.2	Imunizações experimentais
3.3.3	Dosagem de anticorpos IgG e isotipos de IgG induzidos pelas

	imunizações experimentais em camundongos
3.3.4	Determinação da avidez dos anticorpos IgG induzidos pelas
	imunizações experimentais4
3.3.5	Análise da resposta celular4
3.3.5.1	Obtenção das células esplênicas4
3.3.5.2	Proliferação de células T4
3.3.5.3	Dosagem de IFN-γ por ELISPOT4
3.3.5.4	Dosagem de IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A e IL-10 por
0.4	Cytometric Bead Array (CBA)4
3.4	Análise estatística4
4	RESULTADOS5
4.1	Obtenção das proteínas recombinantes em levedura <i>Pichia</i>
	pastoris (yPv) para a imunização experimental de camundongos 5
4.1.1	Proteína Circunsporozoíta quimérica (yPvCSAll _{FL})5
4.1.2	Antígeno 1 de Membrana apical5
4.2	Caracterização biofísica e bioquímica das proteínas yPv 5
4.3	Obtenção das variantes alélicas individuais de <i>Pv</i> CSP para
	aplicação na avaliação da especificidade dos anticorpos anti-
	yPvCSAll _{FL} , ensaio de avidez e análise da resposta celular
4.4	Determinação da resposta de anticorpos induzida em
	camundongos pela vacinação com yPvCSAll _{FL} e yPvAMA-15
4.4.1	Magnitude da resposta de anticorpos IgG (e isotipos de IgG) anti-
	yPvCSAll _{FL} e anti-yPvAMA-15
4.4.2	Determinação da especificidade dos anticorpos anti-
	y <i>Pv</i> CSAll _{FL}
4.4.3	Determinação da longevidade dos anticorpos anti-y <i>Pv</i> CSAll _{FL} e
	anti-y <i>Pv</i> AMA-16
4.4.4	Avaliação comparativa da avidez dos anticorpos induzidos pelas
	construções quiméricas yPvCSAll _{FL} e bPvCSP-All6
4.5	Determinação da resposta celular induzida em camundongos
	C57BL/6 pela vacinação com yPvCSAll _{FL} e yPvAMA-16
4.5.1	Avaliação da proliferação de células TCD3 ⁺
4.5.2	Avaliação da secreção de citocinas
4.5.2.1	Dosagem de IFN-γ por ELISPOT
4.5.2.2	Dosagem de IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A e IL-10 por
7.0.2.2	Cytometric Bead Array (CBA)
	-,,
5	DISCUSSÃO
6	CONCLUSÕES 8
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS8
	ANEXOS
	Anexo 1 - Aprovação no Comitê de Biossegurança da FCF/USP 11
	Alieko I - Aprovação no Connie de Diossegurança da i Oi /OSF 11

Anexo 2 - Certificado de aprovação no Comitê de Ética no Uso de	
Animais (CEUA) da FCF/USP	117
Anexo 3 - Aprovação de alterações do projeto no Comitê de Ética	
no Uso de Animais (CEUA) da FCF/USP	118

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos da malária

A malária é um grave problema de saúde pública mundial e indiscutivelmente a doença parasitária tropical mais devastadora do mundo. Esta patologia leva a óbito crianças, com idade inferior a 5 anos, mais do que qualquer outra doença. Corresponde à quinta causa de morte por doença infecciosa no mundo e a segunda na África (WHO, 2013). De acordo com as últimas estimativas, no ano de 2012, foram registrados cerca de 207 milhões de casos e aproximadamente 627 mil mortes no mundo (WHO, 2013). A maioria dos casos, desse número alarmante, concentra-se na África Tropical, e os demais se distribuem nas Américas Central e Sul, Sudoeste da Ásia e ilhas da Oceania (Figura 1). Estima-se que 3,3 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco.

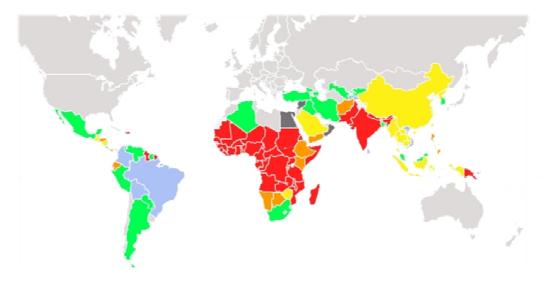


Figura 1 – **Países, áreas de risco e ocorrência de transmissão de malária.** Em **cinza**, as regiões com dados insuficientes. Em **verde**, regiões com 0-20% da população sob risco de infecção. Em **azul**, regiões com 20-40%. Em **amarelo**, regiões com 40-60%. Em **laranja**, regiões com 60-80%. Em **vermelho**, regiões com 80-100%. Fonte: ®2013 Global Malaria Mapper.

Parasitos do filo *Apicomplexa*, gênero *Plasmodium*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*, são seus agentes etiológicos. Há indícios que apontam um quinto agente, o *Plasmodium knowlesi*, que usualmente infecta primatas não humanos, mas, que nos últimos anos, foi associado a casos de malária humana, nas Filipinas, Malásia e Tailândia (WHITE 2008; LEE et al. 2009; KANTELE e JOKIRANTA 2011; SINGH e DANESHVAR 2013).

O *P. vivax* e o *P. falciparum* são as principais espécies que afetam o homem. Entre estas o *P. vivax* possui a maior distribuição geográfica (GARCIA, 2010; WESTENBERGER et al., 2010), e corresponde a segunda espécie em prevalência mundial. Em 2012, as infecções por *P. vivax*, foram relacionadas a 19% de todos os casos registrados no mundo, índice que sobe para 65% quando focamos a região das Américas (WHO, 2013).

O Brasil foi responsável por aproximadamente 52% dos casos de malária e 59% das mortes nas Américas, em 2012 (WHO, 2013), infecção que atinge principalmente as populações da Bacia Amazônica e viajantes (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). A média de casos registrados entre 2004 e 2010 mostra um declínio na incidência de malária no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), porém o número de casos que se mantém elevado, possui distribuição heterogênea. A área de endemicidade do Brasil limita-se a Amazônia Legal, composta pelos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e parte do Maranhão.

As espécies do parasito encontradas no território brasileiro são *Plasmodium* falciparum, *P. vivax* e *P. malariae*. Até a década de 80, registrava-se uma equivalência de casos de malária falciparum e malária vivax, espécies prevalentes, mas o número de casos associados a *P. vivax* está significativamente se distanciando. Hoje, *P. vivax* é a principal espécie causadora de malária, sendo responsável por 85% dos casos registrados (WHO, 2013).

A malária é uma doença aguda sistêmica cuja principal característica clínica, em indivíduos não imunes, é a febre, acompanhada de calafrios e sudorese. Junto a esses sintomas, os pacientes, muitas vezes, são acometidos por dores de cabeça, fadiga e náuseas. Apesar das complicações e da morbidade associada à infecção, costumeiramente serem associadas apenas ao *P. falciparum*, novas abordagens e investigações, assumindo a relevância de *P. vivax*, identificam o registro de complicações decorrentes da infecção por esta segunda espécie (ALEXANDRE et

al., 2010; CHOI et al., 2004; DANIEL-RIBEIRO; LACERDA; OLIVEIRA-FERREIRA, 2008; KOCHAR et al., 2005; PRAKASH et al., 2003).

As principais complicações da malária *vivax* são a anemia e a trombocitopenia, associados a outros distúrbios hematológicos. A primeira é resultado do parasitismo direto das células sanguíneas vermelhas do hospedeiro, e o quadro de trombocitopenia como resultado da combinação de distúrbios na coagulação, da esplenomegalia, de alterações na medula óssea (LACERDA et al., 2011) e de plaquetas, cuja fagocitose apresenta correlação positiva com os níveis de TNF-α circulante (COELHO et al., 2013). O que mostra que a malária *vivax* não só não deve ser mais descrita como benigna, como não deve mais ser negligenciada.

1.2 Ciclo de vida do Plasmodium sp

A investigação da interação entre parasito e hospedeiro humano vem beneficiandose de avanços nos campos de manipulação genética e tecnologia de imagem, os quais estão permitindo que achados *in vitro* sejam extrapolados e testados *in vivo* (AMINO; MÉNARD; FRISCHKNECHT, 2005).

O início da infecção humana é marcado pela transmissão do parasito, sob a forma de esporozoítos, ao hospedeiro humano pelo mosquito fêmea *Anopheles* sp infectado, durante o repasto sanguíneo (Figura 2). Os esporozoítos, apesar de não apresentarem cílios ou flagelos, são formas móveis, cuja motilidade está intimamente associada à reorientação de proteínas em sua superfície, essenciais para a invasão das células do hospedeiro humano (VANDERBERG, 1974; YOELI, 1964), são inoculados na pele (KRETTLI; DANTAS, 2000; SIDJANSKI; VANDERBERG, 1997), local de onde seguem para os hepatócitos.

O modo como o parasito chega aos hepatócitos precisa ser melhor investigado, havendo 2 hipóteses possíveis, o uso direto de capilares dérmicos (SIDJANSKI; VANDERBERG, 1997) e/ou a invasão do sistema linfático, pelo qual o parasito também alcança a circulação sanguínea por canais linfáticos (AMINO et al., 2006).

Os hepatócitos são infectados através da parede sinusóide, que é composta por células de Kupffer, macrófagos hepáticos, após o reconhecimento de receptores de superfície (SINNIS et al., 1996). No interior dos hepatócitos, os esporozoítos são diferenciados em trofozoítos que se multiplicam por esquizogonia originando esquizontes teciduais, que se abrigam no interior de um vacúolo parasitóforo. Esta primeira fase do ciclo é denominada pré-eritrocítica ou tecidual. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* há a particularidade de serem encontradas formas latentes do parasito, que permanecem no interior dos hepatócitos e são denominadas hipnozoítos, formas do parasito que são responsáveis pelas recaídas tardias da doença.

Em modelo murino de *P. berghei*, demonstrou-se que a morte celular deflagrada pela degeneração das mitocôndrias do hepatócito leva ao rompimento do vacúolo parasitóforo e a formação de uma estrutura denominada merossomo que abriga milhares de merozoítos. A membrana do merossomo é derivada da membrana celular do hospedeiro que sofre um remodelamento, protegendo o parasito da ação de células fagocíticas durante o percurso até o lúmen dos sinusóides do fígado, local em que os merozoítos são liberados. Os merozoítos que atingem a circulação encaminham-se para o pulmão, onde o elevado afluxo sanguíneo oferece as melhores condições para o início da invasão dos eritrócitos (STURM et al., 2006).

É a invasão dos eritrócitos que marca o início da fase eritrocítica do ciclo de vida do parasito. A interação do merozoíto com o eritrócito também envolve o reconhecimento de receptores específicos, glicoforinas para *P. falciparum* e a glicoproteina do grupo sanguíneo *Duffy* para *P. vivax*. Outra diferença que pode ser observada é que *P. falciparum* parasita eritrócitos de todas as idades, enquanto que *P. vivax* invade apenas reticulócitos, células imaturas. Estas características possuem implicações diretas sobre a parasitemia verificada nas infecções pelas diferentes espécies de *Plasmodium* (MUELLER et al., 2009).

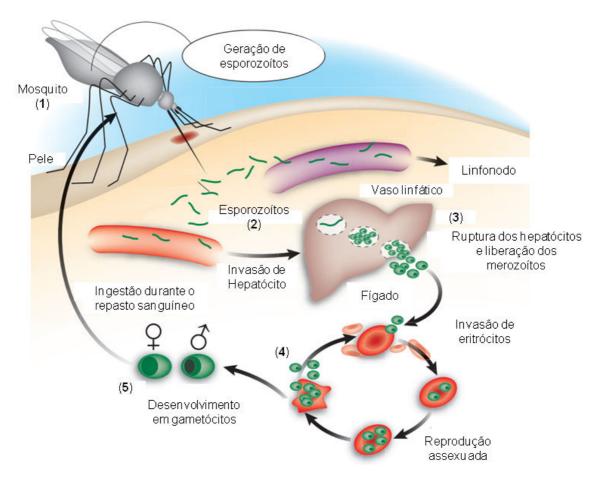


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de vida do *Plasmodium* no hospedeiro vertebrado. Mosquito *Anopheles* sp. (1), esporozoítos (2), hipnozoítos (3), merozoítos (4), gametócitos (5). Adaptado de: (JONES; GOOD, 2006).

O desenvolvimento intra-eritrocítico ocorre por esquizogonia com consequente formação de merozoítos que invadirão novas células sanguíneas. Eventualmente, alguns trofozoítos diferenciam-se em estágios sexuados, gametócitos feminino e masculino, que não sofrem divisão e seguirão seu desenvolvimento no hospedeiro invertebrado (Figura 2 e Figura 3). No mosquito *Anopheles* sp, ocorre a fecundação de gametócitos e são originados os esporozoítos que permanecem armazenados nas glândulas do vetor até sua próxima hematofagia, momento no qual estas formas do parasito são transferidas para o hospedeiro vertebrado infectando-o. A Figura 3 descreve com detalhes a evolução dos gametócitos ingeridos pelo mosquito.

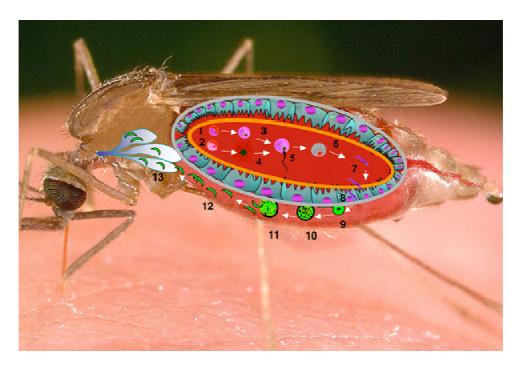


Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de vida do *Plasmodium* no mosquito vetor. Gametócitos feminino (1) e masculino (2) se diferenciam em gametas (3,4). Após a completa meiose, o gametócito masculino origina 8 gametas (4) em um processo denominado exflagelação. O gameta masculino fecunda o gameta feminino (5) gerando um zigoto (6), o qual se diferencia em um oocineto móvel (7). Cerca de 24h depois, o oocineto maduro primeiro atravessa a matriz peritrófica (linha laranja) e em seguida o epitélio do intestino médio (8), depois de se diferenciar em oocisto (9). O oocisto desenvolve-se durante aproximadamente 10 dias (10, 11) e quando atinge a maturidade libera esporozoítos na circulação (hemolinfa) (12). Os esporozoítos circulantes reconhecem e invadem as glândulas salivares do mosquito (13). Adaptado de: (GHOSH; JACOBS-LORENA, 2009).

1.3 Estratégias de controle da malária

O alicerce para o controle da doença, atualmente, baseia-se na prevenção e tratamento precoce e adequado com o uso de quimioterápicos antimaláricos. Os quimioterápicos visam interromper a esquizogonia sanguínea, responsável tanto pela patogenia quanto pelas manifestações clínicas da malária, e particularmente para *P. vivax*, prevenir a ocorrência de recaídas associadas a esquizontes teciduais (WHO, 2013).

A prevenção é feita principalmente atuando sobre o vetor transmissor. A proteção do indivíduo da picada do mosquito *Anopheles* sp explora ações como pulverizações de inseticidas e o uso de mosquiteiros impregnados também com inseticidas (WHITE, 2011; WHO, 2013). Apesar de efetivo, o uso contínuo de um número limitado de pesticidas favoreceu o desenvolvimento de resistência pelo vetor (BUTLER, 2011), fato que associado à seleção de cepas do parasito pelos antimaláricos preconizados, resultado do emprego inadequado e indiscriminado destas moléculas, bem como algumas diversidades espécies-específicas como a existência de formas latentes, atuam como limitantes da erradicação (Figura 4).

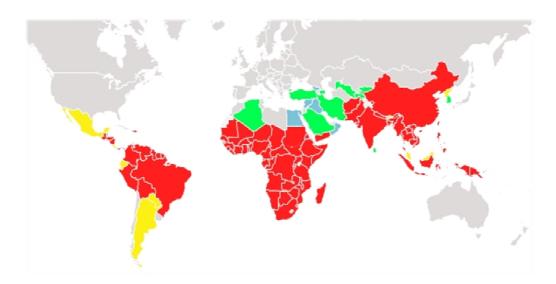


Figura 4 - **Situação atual do controle da malária no mundo.** Em **vermelho**, países sob controle. Em **amarelo**, em pré-eliminação. Em **verde**, em eliminação. Em **azul**, em fase de prevenção de reintrodução. Fonte: ®2013 Global Malaria Mapper.

Neste contexto, novas estratégias terapêuticas são necessárias para o combate à infecção, e a maioria dos especialistas em saúde pública concorda que adicionalmente será necessária a inclusão de uma vacina eficaz, que corresponde à ação mais promissora e com melhor custo benefício (ARNOTT et al., 2013; GREENWOOD, 2005; MALERA CONSULTATIVE GROUP ON VACCINES, 2011). O pouco conhecimento acerca dos mecanismos imunológicos envolvidos na manifestação das inúmeras doenças infecciosas não impediu o sucesso na

obtenção de vacinas contra muitas delas. Porém, mais de 40 anos após os primeiros experimentos de imunização, não há disponível uma vacina eficaz para humanos contra malária.

Os mecanismos imunes envolvidos na proteção contra a malária são extremamente complexos, repletos de lacunas e com alta variabilidade da resposta do hospedeiro humano frente à diversidade de antígenos do parasito, porém análises experimentais e observações de campo sugerem que a indução de uma imunidade protetora contra a malária possa ser um objetivo tangível. Corroboram para essa hipótese o desenvolvimento de proteção assintomática como resultado da inoculação de esporozoítos irradiados em camundongos (NUSSENZWEIG RS, VANDERBERG J, 1967), em primatas não humanos (COLLINS et al., 1989) e no homem (CLYDE, 1990; EPSTEIN et al., 2011; RIECKMANN et al., 1979); o desenvolvimento de uma imunidade naturalmente adquirida altamente variável frente à exposição ao parasito que é cepa-específica (ARÉVALO-HERRERA; CHITNIS; HERRERA, 2010; DREW et al., 2012) que pode ser de longa duração e resultado de mínima exposição ao parasito, ou ainda de curta duração, necessitando de múltiplas e/ou contínuas exposições (DOOLAN; DOBAÑO; BAIRD, 2009; MUELLER et al., 2013); e a indução de proteção pela transferência passiva de anticorpos de indivíduos "imunes" (SABCHAREON et al., 1991).

O desafio do desenvolvimento das formulações vacinais permanece na identificação da melhor combinação de imunoestimuladores. A busca por essa formulação eficaz avança explorando abordagens racionais em frentes complementares de pesquisa, na identificação, seleção e produção de antígenos, e no desenvolvimento de fatores auxiliares de estimulação, os adjuvantes. As abordagens racionais estão longe de simplificar o processo de desenvolvimento de uma formulação vacinal eficaz, uma vez que o parasito expressa ao longo das 3 fases de seu ciclo biológico (pré-eritrocítica, eritrocítica assexuada e eritrocítica sexuada) mais de 5 mil proteínas, cada uma um antígeno potencial, em sua maioria bastante polimórficas. Superando estes obstáculos, limitações técnicas críticas, logísticas e financeiras ainda estão presentes, o que inclui ausência de técnicas robustas de validação dos ensaios de desafio e considerações éticas (HERRERA; CORRADIN; ARÉVALO-HERRERA, 2007).

Nenhuma vacina contra a malária foi licenciada. Os informes mais recentes relatam 1 única formulação candidata em estudos clínicos de fase III, 14 passam por testes clínicos de fase I e II e 17 em estudos pré-clínicos (WHO, 2013). Mais de 60% dessas candidatas baseiam-se em 3 antígenos clonados há mais de 20 anos, a Proteína Circunsporozoíta (CSP, do inglês Circumsporozoite Protein), a Proteína 1 de Superfície de Merozoíto (MSP-1, do inglês Merozoite Surface Protein 1) e o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1, do inglês Apical Membrane Antigen 1) (GIRARD et al., 2007; WHO, 2013). A complexidade do ciclo de vida e a intensa diversidade antigênica do *Plasmodium* inferem que o reconhecimento de um único imunógeno possa ser insuficiente para a obtenção de uma vacina eficaz, fato que estimula a obtenção de formulações compostas por antígenos alvo provenientes de múltiplos estágios, ou multiantígenos, explorando os benefícios individuais de cada anticorpo, célula efetora e citocinas gerados (FERRARO et al., 2013; GOOD; DOOLAN, 2010).

O desenvolvimento intracelular do parasito atua como mecanismo de escape da ação imune do hospedeiro, reduzindo a ação de fatores imunológicos, por isso as estratégias vacinais são direcionadas a curtos períodos de tempo antes da invasão de hepatócitos, reinvasão de eritrócitos ou fertilização de gametas, em que o parasito fica exposto e suscetível (GIRARD et al., 2007; HERRERA et al., 2005; REED; FRIEDE; KIENY, 2006).

Uma formulação vacinal direcionada para a fase pré-eritrocítica do ciclo de vida visa gerar anticorpos capazes de neutralizar os esporozoítos e impedi-los de invadir hepatócitos (HOLLINGDALE, 1990), bem como obter uma imunidade mediada por células TCD3⁺TCD8⁺ e citocinas, como IFN-γ, capaz de eliminar células parasitadas, bloqueando a infecção (HAFALLA; SILVIE; MATUSCHEWSKI, 2011; HOFFMAN; DOOLAN, 2000; NARDIN; NUSSENZWEIG, 1993; RODRIGUES et al., 1991; TSUJI, 2010; WALTHER, 2006) e oferecendo imunidade estéril (NUSSENZWEIG; NUSSENZWEIG, 1989).

A vacina contra malária mais avançada documentada utiliza esta estratégia. Foi desenvolvida numa colaboração do Walter Reed Army Institute (WRAIR) e da Glaxo Smith Kline (GSK). A RTS,S é uma vacina de subunidades recombinantes expressa em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, especificamente direcionada para o *P. falciparum*. O antígeno de superfície (S) da Hepatite B é utilizado como matriz para a

porção C-terminal e os *repeats* de *Pf*CSP, que é administrada com poderosos sistemas adjuvantes (AS, do inglês adjuvant system) como emulsões óleo em água (AS02) ou suspensão lipossomal (AS01), ambos, apresentações dos imunoestimulantes monofosforil lipídio A (MPL) e saponina QS21 purificada de *Quillaja saponaria* (AGNANDJI et al., 2012; BOWMAN et al., 2013; CAMPO et al., 2014; GARÇON; HEPPNER; COHEN, 2003; GUINOVART et al., 2009; WHITE et al., 2013a; WHITE, 2011).

Ensaios clínicos de fase IIa, com indivíduos voluntários de áreas não endêmicas desafiados com picadas de mosquitos infectados com *P. falciparum*, resultou em proteção de 32-50% (KESTER et al., 2007, 2008). Uma imunidade protetora que pode ser correlacionada a elevados títulos de anticorpos IgG circulantes contra os *repeats* de CSP (WHITE et al., 2013a). Em ensaios de fase III com crianças africanas, residentes de áreas endêmicas, a formulação RTS,S/AS01E demonstrou eficácia de 49,5%, entre crianças de 5-17 meses de idade, e de 30,1%, entre crianças de 6-12 semanas de idade, na proteção contra episódios clínicos e severos (AGNANDJI et al., 2012).

Apesar dos promissores resultados, a necessidade de elevadas doses da vacina de CSP para que seja atingida uma imunidade esterilizante, e o fato de que um único esporozoíto que faça evasão da neutralização imune humana é suficiente para dar continuidade à infecção (REED; FRIEDE; KIENY, 2006), tornam necessária a utilização de estratégias complementares. Os antígenos eritrocíticos assexuados, presentes principalmente na superfície e nas organelas apicais do merozoíto induzem anticorpos específicos capazes de bloquear a invasão do merozoíto, e assim impedir a manifestação dos sintomas associados à infecção e proteger contra a evolução para a forma grave da doença. A inibição dos ciclos de invasão de eritrócitos acarreta a redução da parasitemia e consequentemente a redução da morbidade e da mortalidade. Dados de modelos animais sugerem ainda que o controle da densidade de parasitos, gerado por AMA-1, propicia a redução da geração de gametócitos no sangue do hospedeiro vertebrado bloqueando também a transmissão da doença, já que estas formas sanguíneas sexuadas podem ser transferidas para um novo hospedeiro invertebrado, infectando-o (FINNEY; RILEY; WALTHER, 2010; RICHARDS; BEESON, 2009).

1.4 Antígenos alvos

Os 2 antígenos mais promissores para a obtenção de uma vacina contra a malária *vivax* são a Proteína Circunsporozoíta e o Antígeno 1 de Membrana Apical (MUELLER et al., 2013).

1.4.1 Proteína Circunsporozoíta (CSP)

A Proteína Circunsporozoíta é a componente majoritária da superfície dos esporozoítos, sendo necessária para o processo de invasão das células hepáticas do hospedeiro humano (MCCUTCHAN et al., 1996; STEWART et al., 1986). Os genes de CSP estão bem caracterizados e a análise da estrutura primária de *Pv*CSP, assim como nas demais espécies de *Plasmodium*, identifica 3 regiões claramente definidas, uma extensa região central de aminoácidos em *tandem repeats* espécies-específicos que ocupa mais de 1/3 da molécula (ARNOT; BARNWELL; STEWART, 1988; ARNOT et al., 1985; HERRINGTON et al., 1987), flanqueada por 2 regiões altamente conservadas, região I, N-terminal composta por 5 aminoácidos (KLKQP) que se liga a proteoglicanos (ALEY et al., 1986; CERAMI et al., 1992; DAME et al., 1984) e região II, C-terminal com domínio de adesão celular TSR (trombospondina). A região C-terminal possui 2 pares conservados de cisteínas (DAME et al., 1984) necessários para a conformação, reconhecimento do receptor da superfície dos hepatócitos expostos ao fluxo sanguíneo (CERAMI et al., 1992; PANCAKE et al., 1992) e atividade invasiva (Figura 5).

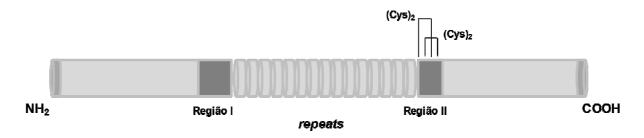


Figura 5 - **Representação esquemática da Proteína CS de** *Plasmodium*. Adaptado de: (NARDIN; NUSSENZWEIG, 1993).

Em contraste com a região central de *P. falciparum*, isolados de *P. vivax*, apresentam variações alélicas para esta porção. As sequências de aminoácidos GDRA[A/D]GQPA, caracterizam o genótipo clássico VK210 (ARNOT et al., 1985) que com VK247, sequência ANGA[G/D][N/D]QPG (ROSENBERG et al., 1989) são os alelos mais frequentes em comparação ao terceiro genótipo, o *P. vivax-like* (APGANQ[E/G]GGAA) (COCHRANE et al., 1990; GOPINATH et al., 1994; QARI et al., 1991, 1993a, 1994), as quais não apresentam reconhecimento cruzado por anticorpos policionais (QARI et al., 1991). Esta variabilidade alélica é conservada por pressão evolutiva, como mais uma estratégia de escape imune do parasito (GALINSKI et al., 1987), e todas as 3 variantes identificadas possuem distribuição mundial (IMWONG et al., 2005; KAIN et al., 1992; MACHADO; PÓVOA, 2000; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004; STORTI-MELO et al., 2009; ZAKERI et al., 2006).

A primeira observação de sucesso de indução de proteção estéril contra a infecção por malária foi demonstrada em camundongos imunizados com esporozoítos de *P. falciparum* atenuados por irradiação (NUSSENZWEIG RS, VANDERBERG J, 1967), e esta resposta induzida tornou-se o padrão ouro para o desenvolvimento de uma vacina contra malária (HOFFMAN et al., 2002; RIECKMANN et al., 1979). ROESTENBERG (2009) obteve um significativo sucesso na indução de proteção com a inoculação de esporozoítos de *P. falciparum* intactos, sob cobertura de cloroquina, contra desafio homólogo. Todos os indivíduos avaliados no estudo foram protegidos, e 4 dos 6 participantes do estudo mantiveram a proteção, mesmo 2 anos após a exposição (ROESTENBERG et al., 2011).

Esta estratégia, embora eficaz é limitada por desafios únicos em termos de segurança, virulência residual e potencial de reversão da virulência (MAHAJAN et al., 2010), além de consideráveis dificuldades na produção, purificação e preservação dos esporozoítos atenuados assepticamente. Estes empecilhos tornam inviáveis as imunizações em massa e levaram as pesquisas a se concentrarem na identificação de epítopos imunoestimulantes para a geração de proteínas recombinantes e peptídeos, os quais demonstram menor eficácia (TARGETT; GREENWOOD, 2008) e requerem a adição de adjuvantes para fornecer um ambiente estimulante eficaz (MCKEE et al., 2010).

Os anticorpos induzidos por esporozoítos irradiados são predominantemente direcionados contra a proteína CS, apesar da rápida permanência dos esporozoítos na circulação sanguínea. Estes anticorpos podem diminuir a motilidade dos esporozoítos, inibindo assim a invasão dos hepatócitos e o crescimento do parasito dentro dos mesmos, e com isso levar a redução da parasitemia. Estas observações em *P. falciparum* e *P. berghei* impulsionaram as pesquisas em busca de uma vacina contra malária a focarem-se por um longo período predominantemente em CSP. A obtenção de uma vacina eficaz contra o estágio pré-eritrocítico da infecção requer não só a indução de resposta humoral (POTOCNJAK et al., 1980), mas a indução de resposta por células TCD3⁺TCD8⁺ e TCD3⁺TCD4⁺ (RÉNIA et al., 1993; RODRIGUES et al., 1991; ROMERO et al., 1989), uma ação combinada de anticorpos prevenindo a infecção e células eliminando hepatócitos infectados (ARÉVALO-HERRERA; CHITNIS; HERRERA, 2010).

Após invadir os hepatócitos, fragmentos dos antígenos são apresentados na superfície da célula hepática, os quais podem ser reconhecidos por células TCD3⁺TCD8⁺ citotóxicas (NOSSAL, 2011). As células *Natural Killer* (NK) e TCD3⁺TCD8⁺ são induzidas por IL-12 (interleucina 12), produzida pelo contato de macrófagos, de células dendríticas e das células de Kupffer com a CSP, e possuem papel crítico na destruição direta do hepatócito infectado, já que a secreção de IFN-γ, principal molécula efetora, via perforinas e granzimas, deflagra a produção de reativos intermediários pelos hepatócitos, como óxido nítrico, tóxico para parasitos intracelulares (ARTAVANIS-TSAKONAS; RILEY, 2002; HOFFMAN; DOOLAN, 2000; HOLLINGDALE et al., 1984; RILEY et al., 2006). As células TCD3⁺TCD4⁺ atuam

complementariamente, auxiliando na ativação e diferenciação de células B ou de linfócitos T citotóxicos (LTC) (DOOLAN; MARTINEZ-ALIER, 2006).

As regiões N- e C-terminais da CSP podem ser alvos da ação de anticorpos (ANCSIN; KISILEVSKY, 2004; RATHORE et al., 2005; TEWARI et al., 2002), porém é para a região central, onde se encontram epítopos para células B, que a maior parte da resposta por anticorpos neutralizantes é dirigida (GONZÁLEZ et al., 2001; KAIN et al., 1992), observação que é reforçada por estudos utilizando peptídeos da região central de *P. vivax* em camundongos C57BL/6 (YADAVA et al., 2007) e macacos *Saimiri* (YANG et al., 1997).

No Brasil, poucos estudos foram realizados para avaliar a incidência das variantes e a prevalência de anticorpos contra a proteína CS. A ocorrência das variantes VK210, VK247 e *P. vivax like* foi documentada (MACHADO; PÓVOA, 2000; STORTI-MELO et al., 2009) em áreas endêmicas da Amazônia Legal por PCR e por sorologia no Pará (MACHADO et al., 2003), por sorologia em Rondônia e Mato Grosso (ARRUDA et al., 2007) e por sorologia em não endêmicas como São Paulo (CURADO et al., 1997). Nos Estados mencionados verificou-se uma maior prevalência da variante VK210 (reconhecimento de cerca de 80%) em detrimento das outras 2 (40-60%) que apresentaram distribuição semelhante. Frequências que inferem uma melhor adaptação do alelo VK210 (MACHADO et al., 2003).

Baseados na variabilidade alélica de *Pv*CSP e dos resultados promissores da vacina RTS,S, TEIXEIRA e colaboradores (2014) geraram 3 proteínas recombinantes representando os alelos da proteína CS de *P. vivax*, bem como um polipeptídeo híbrido fusionando todos os epítopos de CSP através do sistema bacteriano de expressão. Em protocolos homólogos e heterólogos (proteínas e/ou adenovírus) de imunização de camundongos C57BL/6, na presença do adjuvante Poly(I:C), 3 das 4 proteínas recombinantes geraram elevados títulos de anticorpos, de longa duração, comparáveis aos obtidos com a combinação dos adjuvantes ACF/AIF (adjuvantes completo e incompleto de Freund). Anticorpos contra o polipeptídeo híbrido reconheceram epítopos das 3 variantes alélicas individuais, mas os títulos de IgG induzidos mostraram-se inferiores aos obtidos pela coadministração das outras 3 construções, cujos anticorpos ainda foram capazes de reconhecer a proteína nativa em ensaios de imunofluorescência. Em ensaios de especificidade não identificou-se o predomínio do reconhecimento dos *repeats* centrais em relação as regiões N- e C-

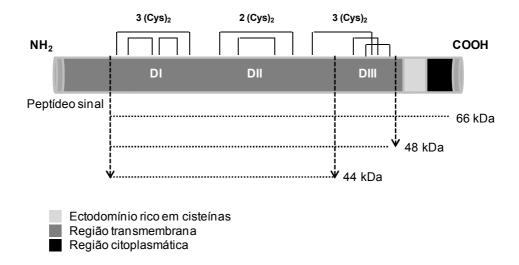
terminal dos anticorpos induzidos por nenhuma das construções de *Pv*CSP. E apesar de induzirem elevada resposta imune por anticorpos, não foi possível identificar resposta específica por células T a nenhuma das 4 construções em ensaios de estimulação de esplenócitos com peptídeos sintéticos cobrindo toda a extensão de *Pv*CSP *in vitro*, ELISPOT ou detecção de secreção de citocinas no sobrenadante de cultura.

1.4.2 Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1)

A proteína AMA-1 é expressa no polo apical das formas esporozoíticas e merozoíticas do parasito (BAI et al., 2005; SILVIE et al., 2004). Trata-se de uma proteína transmembrana encontrada em todas as espécies do *Plasmodium* sp e outras do filo *Apicomplexa*, como *Toxoplasma* e *Babesia* (BAI et al., 2005; PIZARRO et al., 2005; REMARQUE et al., 2008a). O ectodomínio de AMA-1 é rico em cisteínas (16 resíduos), que ao formarem pontes dissulfeto promovem o dobramento da molécula em 3 domínios (Figura 6A) (HODDER et al., 1996; REMARQUE et al., 2008a), fato comprovado com a publicação da estrutura cristalográfica de uma proteína recombinante AMA-1 de *P. vivax* produzida (cepa Salvador, SaII) em leveduras *Pichia pastoris*, (Figura 6B) (PIZARRO et al., 2005).

Intensos polimorfismos nos domínios I e II estão correlacionados a escapes conformacionais ao sistema imune do hospedeiro, impedindo o acesso de anticorpos aos sítios de ligação no parasito (ARNOTT et al., 2013; COLEY et al., 2007). Segundo observações experimentais, a diversidade de *Pf*AMA-1 esta localizada principalmente no domínio I (ESCALANTE et al., 2001; ORD; TAMI; SUTHERLAND, 2008), enquanto que a de *Pv*AMA-1, superior a das demais espécies de *Plasmodium*, conforme muito recentemente proposto (NEAFSEY et al., 2012), divide-se entre os domínios I e II (ORD; TAMI; SUTHERLAND, 2008; PUTAPORNTIP et al., 2009).

A.



В.

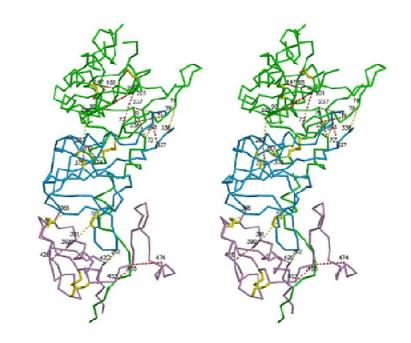


Figura 6 - Representação esquemática da proteína AMA-1 de *Plasmodium* e estrutura cristal de *Pv*AMA-1. Destacados em (A.) os fragmentos resultantes da clivagem proteolítica da proteína, adaptado de: (HOWELL et al., 2003), e em (B.) a estrutura cristalográfica de AMA-1 de *P. vivax*, na qual em **verde** o domínio I, em **azul** o domínio II e em **roxo** o domínio III. As pontes de dissulfeto estão indicadas em **amarelo.** Adaptado de: (CHESNE-SECK et al., 2005).

A expansão geográfica de *P. vivax* permitiu que o aumento de sua transmissão ocasionasse a intensa recombinação genética justificando a diversidade de *Pv*AMA-1 (NEAFSEY et al., 2012; OSIER et al., 2010) mesmo entre áreas geográficas comuns (ARNOTT et al., 2013). O polimorfismo do antígeno, associado a elevado

potencial de escape imune, inferem que as formulações vacinais baseadas em AMA-1 precisarão conter múltiplos alelos, gerando imunidade cruzada (DREW et al., 2012; TAKALA et al., 2009), contornando as respostas espécie e alelo-específicas (THERA; PLOWE, 2012; THERA et al., 2011).

AMA-1 é liberado dos micronemas como um precursor de 83 kDa que é convertido, durante seu transporte à superfície, em uma proteína de 66 kDa (CREWTHER et al., 1990; HEALER et al., 2002), a qual é clivada finalmente em fragmentos de 44 e 48 kDa (HOWELL et al., 2001) durante o processo de invasão (Figura 6). Apesar de a função de AMA-1 de *Plasmodium* sp não estar totalmente clara, esta proteína é necessária para a ocorrência da invasão das células do hospedeiro humano por *P. falciparum* (MITCHELL et al., 2004; REMARQUE et al., 2008a; SILVIE et al., 2004) e seu gene (*ama-1*) é essencial para a sobrevivência do parasito (TRIGLIA et al., 2000).

GIOVANNINI e colaboradores (2011) demonstraram em modelo murino de infecção (*P. berghei*) que esporozoítos nocauteados para AMA-1 mantiveram a capacidade de invasão de hepatócitos e diferenciação em merozoítos, porém se tornaram incapazes de invadir eritrócitos ao alcançar a circulação sanguínea. Esta observação, juntamente com o fato de que anticorpos anti-AMA-1 foram associados ao bloqueio da invasão de células do hospedeiro intermediário, propõem o envolvimento desta proteína no processo de reorientação apical do parasito, após a adesão inicial (DUTTA et al., 2005; HEALER et al., 2002; HODDER; CREWTHER; ANDERS, 2001; KOCKEN et al., 2002; LALITHA et al., 2004; MITCHELL et al., 2004; SILVIE et al., 2004), no estabelecimento de uma junção, com a participação da proteína RON-2 (SRINIVASAN et al., 2011) e estabilização que antecedem o processo de invasão eritrocítico.

A elevada imunogenicidade de AMA-1, pode ser observada em infecções naturais (MORAIS et al., 2006; MÚFALO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2005; THOMAS et al., 1994), e em imunizações experimentais com a proteína nativa de *P. knowlesi* emulsificada em saponina inoculada em macacos *Rhesus* (DEANS et al., 1988), com construções recombinantes bacterianas de *P. chabaudi* com Montanide ISA 720 em camundongos (ANDERS et al., 1998), de *P. fragile* com ISA 720 em macacos *Saimiri sciureus boliviensis* (COLLINS et al., 1994), de *P. vivax* em camundongos BALB/c com diferentes adjuvantes (GENTIL et al., 2010; MÚFALO et al., 2008) e em

macacos *Macaca mullata* com SBAS2 [emulsão óleo em água de MPL e QS21, (KOCKEN et al., 1999)], as quais induziram elevados títulos de anticorpos IgG.

VICENTIN e colaboradores (2014) obtiveram o ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax* pelo sistema de expressão em *P. pastoris*, e esta proteína recombinante se mostrou antigênica contra soros de indivíduos infectados com *P. vivax* provenientes de diferentes regiões do estado do Pará (62,5%), e imunogênica em imunizações experimentais de camundongos BALB/c, submetidos a protocolos de imunizações homólogos e heterólogos de indução e reforço (DNA e/ou proteína recombinante), explorando os adjuvantes sais de alumínio (Alum), monofosforil lipídio A (MPLA) de *Bordetella pertussis*, flagelina FliC de *Salmonella Typhimurium*, saponina Quil A, ou adjuvante incompleto de Freund (AIF). Os adjuvantes AIF e Quil A foram associados aos títulos mais elevados de anticorpos IgG específicos, seguidos por Alum e MPLA. Entre esses, os anticorpos gerados, na presença de MPLA e Quil A, foram capazes de reconhecer a proteína nativa de isolados tailandeses em ensaios de imunofluorescência, e ainda, no caso de Quil A, também inibiram a invasão de reticulócitos de 4 diferentes isolados, também da Tailândia.

1.5 Coadministração de antígenos e uso de proteínas quiméricas

A lacuna de uma formulação vacinal protetora e eficaz contra malária requisita a combinação de estratégias antevendo evasões do parasito ao sistema imune humano devido às variações alélicas e antigênicas dos antígenos de *Plasmodium*, comumente relatadas. Racionalmente, formulações polivalentes e/ou quiméricas, combinando diferentes imunoestimulantes tendem a deter melhor prognóstico para alcançar a amplitude e eficácia de resposta não alcançada até o momento com vacinas de subunidades (DOOLAN; HOFFMAN, 2001; SINGH et al., 2012). As formulações multiestágios e multiantígenos, apesar do aspecto promissor, possuem maior complexidade, a possibilidade de competição entre os componentes, elevação de custo e acarretam ainda dificuldades na avaliação e interpretação da resposta induzida (NOSSAL, 2011; RICHARDS; BEESON, 2009; TAKALA; PLOWE, 2009). A

identificação desses policomponentes baseia-se em análises genéticas e estruturais, identificando polimorfismos imunologicamente relevantes, que devam ser incluídos nas formulações para evitar o escape antigênico e a seleção de genótipos, fatos que poderiam acarretar a seleção de parasitos resistentes (TAKALA; PLOWE, 2009).

Trabalhos recentes descrevem a obtenção de construções quiméricas, fusionando diferentes antígenos e alelos, bem como a administração combinada de candidatos potenciais. Estas formulações vacinas propostas incluem formulações proteicas como *Pc*AMA-1/*Pc*MSP-1₄₂ (BURNS et al., 2003), GMZ2 (ESEN et al., 2009), PfCP2.9 (LANGERMANS et al., 2006; MALKIN et al., 2007; PAN et al., 2004), PvAMA-1/PvMSP-3β/PvMSP-1₁₉ (CASALE, 2013; PEREIRA, 2012) e His₆-PvCSP-VK210/His₆-PvCSP-VK247/His₆-PvCSP-P. vivax-like (TEIXEIRA et al., 2014)b, bem como DNA plasmidial e vetores virais como ME-TRAP (MCCONKEY et al., 2003; WEBSTER et al., 2006), NYVAC-Pf7 (OCKENHOUSE et al., 1998), ChAd63/MVA ME-TRAP) (REYES-SANDOVAL et al., 2010), NMRC-M3V-Ad-PfCA (SEDEGAH et al., 2011; TAMMINGA et al., 2011), e poliproteínas como L3SEPTL (PRIEUR et al., 2004), MSP₁-MSP₂-RESA (GENTON et al., 2003), VMP001 (BELL et al., 2009; LUMSDEN et al., 2011, 2012; MOON et al., 2011, 2012; U.S.A.M.R.M.C., 2013; VANLOUBBEECK et al., 2013; YADAVA et al., 2007, 2012), PyCSP/PyMSP-1 quimérica (SINGH et al., 2012) e His₆-PvCSP-All (TEIXEIRA et al., 2014).

De modo geral, os resultados são dependentes da combinação de antígenos e escolha de adjuvantes (JIANG et al., 2007; ROGERS et al., 2002; SEDEGAH et al., 2004). A competição entre os imunoestimulantes pode revelar prejuízo para um dos componentes com relação às específicas respostas de títulos de anticorpos induzidos (PICHYANGKUL et al., 2009) e por células TCD3⁺TCD4⁺ e TCD3⁺TCD8⁺ (FORBES et al., 2011).

Entre as formulações citadas, *Pf*CP-2.9 [AMA-1(III)/MSP-1₁₉] é exemplo de sucesso da abordagem multiantígeno. Esta poliproteína explorou uma plataforma de inibição das células do hospedeiro humano por esporozoítos e merozoítos. Os anticorpos induzidos em camundongos, coelhos e macacos por esta construção mostraram-se capazes de inibir o estágio sanguíneo e o crescimento *in vitro* do parasito (PAN et al., 2004). Em estudo posterior, baseando-se nos resultados positivos previamente obtidos, adicionou-se o antígeno pré-eritrocítico CSP, alteração que acarretou redução nos títulos de anticorpos induzidos em camundongos (ZHANG et al., 2007).

Outros exemplos são as vacinas coadministrando *Pc*AMA1 e *Pc*MSP-1₄₂, na presença dos adjuvantes ACF, MPLA combinado com dicorinomicolato de trealose (RAS), Quil A e Alum, que induziram em camundongos C57BL/6, proteção contra infecções por *P. chabaudi*. A combinação destas proteínas recombinantes, na presença de Alum, gerou níveis moderados de anticorpos IgG e mostrou eficácia na redução da parasitemia em animais desafiados (BURNS et al., 2003). Anticorpos induzidos em coelhos contra a combinação de CSP e uma proteína quimérica baseada em MSP-1 de *P. yoelli*, na presença de Montanide ISA 51, promoveram a redução da parasitemia de camundongos CAF1/J (H-2^{d/a}) de 81% para 38,2%, bem como indução de células TCD3⁺TCD4⁺ secretoras de IL-2, TNF-α e IFN-γ (SINGH et al., 2012). A vacina tricomponente MSP-1/MSP-2/RESA, baseada em antígenos de *P. falciparum*, na presença de Montanide ISA 720, foi associada a uma redução de 62% da carga parasitária em crianças de 5-9 anos (GENTON et al., 2003).

Direcionada para *P. vivax*, a vacina VMP001, é a única formulação para essa espécie em estudos clínicos (fase I/IIa). Esta formulação vacinal baseia-se em uma CSP recombinante, com uma região central quimérica, que fusiona epítopos das variantes VK210 e VK247 de *Pv*CSP, produzida em *Escherichia coli*. As imunizações de camundongos C57BL/6 e CD-1, na presença Montanide ISA-51 e AIF, e de macacos *Rhesus* com AS01 [NCT01157897] mostraram-se altamente imunogênicas, com produção de anticorpos IgG contra as regiões N-terminal, C-terminal e *repeats* centrais de ambas as variantes alélicas, os quais ainda reconheceram a proteína nativa em ensaios de imunofluorescência utilizando esporozoítos vivos e fixados (BELL et al., 2009; LUMSDEN et al., 2011; VANLOUBBEECK et al., 2013; YADAVA et al., 2007, 2012).

A poliproteína produzida por TEIXEIRA e colaboradores (2014) em *E. coli* fusiona, na região central, epítopos das 3 variantes alélicas de *Pv*CSP. A proteína recombinante, na presença do adjuvante Poly(I:C), mostrou-se imunogênica em camundongos C57BL/6, cujos anticorpos reconheceram epítopos das 3 variantes adicionadas, sem prevalência do reconhecimento destes *repeats* em relação as regiões N- e C-terminal da proteína.

1.6 Adjuvante ácido poli-inosínico-poli-citidídilico

Na infecção por *Plasmodium* as respostas imunes inatas desencadeiam o processo inflamatório e a produção de citocinas (BACCARELLA et al., 2013). Os mecanismos envolvidos na indução imune continuam pouco conhecidos, porém ensaios com formulações vacinais recentes demonstram que a sinalização (KASTURI et al., 2011) e estimulação inato-específica, intensificada por potentes moléculas adjuvantes (AKIRA, 2011; KASHALA et al., 2002; LUMSDEN et al., 2012; MBOW et al., 2010), é importante para a resposta adaptativa em humanos (DRUILHE et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005; POLHEMUS et al., 2009).

A imunogenicidade das proteínas recombinantes deste trabalho foi avaliada na presença do adjuvante ácido poli-inosínico-poli-citidílico de elevada massa molecular Poly(I:C) HMW (1,5-8 Kb, InvivoGen, USA Inc., San Diego, CA), molécula selecionada por ser liberada para uso em humanos, e que corresponde a um análogo sintético de RNA de cadeia dupla (dsRNA), agonista de receptores TLR3, bastante empregado em estudos sobre a resposta imune inata (MIAN et al., 2013) e reconhecido pela indução de fortes respostas contra doenças infecciosas e cânceres (ALVING et al., 2012; MIAN et al., 2013; PERRET et al., 2013; STAHL-HENNIG et al., 2009).

O Poly(I:C) atua estimulando a produção de células T efetoras antígeno-específicas, principalmente por sinalização NF-KB (fator nuclear kappa B), promovendo a maturação de células dendríticas tipo I a células apresentadoras de antígenos competentes, associada à estimulação de IFNs tipo I, citocinas pró-inflamatorias e quimiocinas (AVRIL et al., 2009; KAWAI; AKIRA, 2008; PERRET et al., 2013), prérequisitos para a indução de imunidade adaptativa, sendo um promissor componente para a composição de novas formulações vacinais.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta imune humoral e celular induzidas, em camundongos, pela imunização com proteínas recombinantes do estágio pré-eritrocítico (*Pv*CSP) e eritrocítico (*Pv*AMA-1) de *P. vivax*, expressas em leveduras *Pichia pastoris*.

2.2 Objetivos específicos

- Gerar uma nova proteína recombinante quimérica representando a Proteína Circunsporozoíta de *P. vivax* com os epítopos VK210, VK247 e *P. vivax-like* fusionados (yPvCSAll_{FL}) a partir da levedura *P. pastoris*.
- ii. Expressar e purificar a proteína recombinante *Pv*AMA-1 gerada previamente em *P. pastoris* (y*Pv*AMA-1).
- iii. Avaliar a resposta de anticorpos induzida em camundongos pela imunização com as 2 proteínas simultaneamente e por cada uma delas separadamente, na presença do adjuvante ácido poli-inosínico-poli-citidílico [Poly(I:C)], segundo os seguintes parâmetros:
 - a. Especificidade dos anticorpos induzidos contra y*Pv*CSAll_{FL};
 - b. Avidez dos anticorpos induzidos contra y*Pv*CSAll_{FL};
 - c. Longevidade dos anticorpos induzidos contra yPvCSAll_{FL} e yPvAMA-1;
 - d. Influência da combinação de proteínas recombinantes na indução de resposta por anticorpos.
- iv. Avaliar comparativamente a resposta celular (linfoproliferação e detecção de citocinas) induzida em camundongos pelas diferentes formulações.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção e caracterização das proteínas expressas em leveduras *P. pastoris* (y*Pv*)

3.1.1 Proteína Circunsporozoíta quimérica (yPvCSAII_{FL})

3.1.1.1 Gene sintético de yPvCSAII_{FL}

A construção do gene sintético que codifica a sequência de yPvCSAII_{FL} (Proteína Circunsporozoíta de *P. vivax All epitopes Full Lenght*) foi realizada com base na sequência de aminoácidos da Proteína CS de *P. vivax* (ARNOT et al., 1985; COCHRANE et al., 1990; GOPINATH et al., 1994; QARI et al., 1991, 1993b, 1994; ROSENBERG et al., 1989). O gene empregado neste estudo inicia-se imediatamente após a sequência sinal, com os aminoácidos THCGH, e é idêntico à sequência base até a região conservada I (KLKQP), N-terminal. A proteína recombinante quimérica apresenta, em sua região central, 5 cópias da sequência *repeat* do alelo clássico (VK210) GDRA[A/D]GQPA, seguida por 5 cópias do *repeat* de *P. vivax-like* APGANQEGGAA e 4 cópias do *repeat* de VK247 ANGAGNQPG. Este bloco de sequências de repetição em *tandem repeat* foi seguido pela região C-terminal, idêntica à sequência base de CSP de *P. vivax*, terminando nos aminoácidos TDVCT, pouco antes da região âncora (GPI) (Figura 7).

O gene foi comercialmente obtido (GenScript USA Inc., Piscataway, NJ), tendo sido removidos potenciais sítios de glicosilação e os códons componentes da sequência foram optimizados para expressão em levedura *P. pastoris*. A remoção dos sítios de glicosilação mencionados visou prevenir os processos de hiperglicosilação

diferenciada característicos da levedura que comprometeriam a estrutura proteica final desejada. A frequência de utilização dos códons de *P. pastoris* e *P. vivax* foram calculadas utilizando o algoritmo OptimumGeneTM (GenScript USA Inc.), e quando necessário, os códons de *P. vivax* foram modificados para expressão ótima em *P. pastoris*, caracterizando a optimização. O viés de códon *usage* foi elevado para *P. pastoris*, obtendo um CAI (*Códon Adaptation Index*) de 0,83. O CAI representa a distribuição da frequência de utilização dos códons ao longo do comprimento da sequência do gene, assim o valor de CAI pode ser utilizado para inferir o nível de expressão gênica. O valor máximo para um CAI é de 1,0. O conteúdo CG obtido foi de 53,64%, sendo que o intervalo ideal situa-se entre 30 e 70% (GenScript USA Inc.).

VEFHHHHHHTHCGHNVDLSKAINLNGVNFNNVDASSLGAAHVGQSASRGRGLGENPDDEEGDAKKKKDGKKAEPKNPRENKLKQPGPGDRADGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANGAGNQPGANGAGNQPGANGAGNQPGANGAGNQPGANGAGNQPGANGAGNAPNEKSVKEYLDKVRATVGTEWTPCSVTCGVGVRVRRRVNAANKKPEDLTLNDLETDVCTHHHHHHHStopRAA

Figura 7 - **Sequência de aminoácidos de yPvCSAII**_{FL}. Em grafia **azul** as sequências de hexa-histidina. Destacado com sombreado em **amarelo** a sequência retirada da região central do alelo VK210. Destacado com sombreado **azul** a sequência retirada da região central do alelo *P. vivax-like*. Com sombreado em **verde** a sequência retirada da região central do alelo VK247.

3.1.1.2 Obtenção e seleção dos clones transformantes de yPvCSAll_{FL}

Às extremidades 3' e 5' do gene sintético de yPvCSAll_{FL} (Figura 7) foram adicionadas sequências de hexa-histidina (His₆), imediatamente após e antes, aos sítios das enzimas de restrição *Eco*RI e *Not*I (New England Biolabs USA Inc., Ipswich, MA), e este foi subclonado no vetor pPIC9K (Invitrogen, Life Technologies

Corporation USA Inc., Waltham, MA), o qual contém um peptídeo sinal (α-factor) para expressão secretada. O plasmídeo resultante (Figura 8), denominado pPIC9K-yPvCSAll_{FL}, foi transformado em bactérias *E. coli* linhagem DH5-α (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) para expansão clonal. O DNA obtido por digestão alcalina teve a integridade dos sítios enzimáticos e orientação confirmadas por análises de restrição utilizando as enzimas *Sal*I, *Bgl*II, *Eco*RI, *Not*I e *Hinc*II (New England Biolabs USA Inc.). A integridade da sequência foi confirmada por sequenciamento prévio realizado pela GenScript.

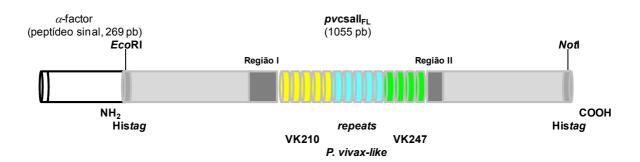


Figura 8 - Representação esquemática da fase de leitura aberta da sequência de yPvCSAll_{FL} presente no vetor pPlC9K para expressão em *P. pastoris*. Em amarelo a sequência de *repeats* da variante de *Pv*CSP VK210, em azul de *P. vivax-like* e em verde de VK247.

Para a transformação em *P. pastoris*, linhagem GS115 (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.), 40 μg do plasmídeo pPIC9K-y*Pv*CSAll_{FL} foram digeridos com as enzimas de restrição *Sal*I ou *Bgl*II (New England Biolabs USA Inc.), e precipitado de acordo com as instruções do fabricante (manual pPIC9K, *A Pichia Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression, guide version G*, Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.). Após 16-18 horas a 37°C, a precipitação do DNA foi realizada através da adição a este de dois volumes de etanol absoluto (álcool etílico) [Merck KGaA DEU Inc., Darmstadt, HE] -20°C e incubação de 16-18 horas a -20°C. Ao final deste período, o material foi centrifugado a 15.000 x g por 15 minutos a 4°C, e o sedimento foi lavado com 500 μL de etanol 70% em água (v/v), -20°C, para então ser novamente centrifugado nas mesmas condições. Após

secagem do sedimento à temperatura ambiente (T.A.,~25°C), este foi solubilizado em 10 µL de água MilliQ estéril (Millipore, Merck KGaA DEU Inc.).

Uma colônia de levedura foi inoculada em 500 μL de meio YPD [1% (m/v) extrato de levedura (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.), 2% (m/v) peptona (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) e 2% (m/v) glicose (Fluka, Sigma-Aldrich USA Co. LLC, St. Louis, MO)] e incubada a 28-30°C por 16-18 horas sob agitação constante de 230 rpm. Após saturação, 400 μL desta pré-cultura foi inoculada em 0,5 L de meio YPD. A cultura foi incubada novamente, nas mesmas condições acima mencionadas, até densidade óptica a 600 nm (D.O.₆₀₀) de 1,3-1,5, quando foi centrifugada a 2.465 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular lavado 2 vezes com 250 mL de água MilliQ estéril, 4°C, e 1 vez com 20 mL de D-Sorbitol 1 M estéril (Sigma-Aldrich USA Co. LLC), 4°C. Uma última centrifugação foi realizada e as células, agora competentes, foram solubilizadas em 0,5 mL de D-Sorbitol 1 M estéril, 4°C.

Para a transformação, $80~\mu L$ de células competentes foram misturados a $40~\mu g$ de DNA linearizado, purificado e solubilizado em $10~\mu L$ de água MilliQ. As células foram transferidas para uma cubeta de 0.2~cm (Bio-Rad Laboratories USA Inc., Hercules, CA), a - 20° C, e incubadas, no gelo, por 5 minutos. A cubeta foi submetida, no eletroporador Gene Pulser/MicroPulser (Bio-Rad Laboratories USA Inc.), a pulso nas condições de 1.500~V (voltagem), $200~\Omega$ (resistência) e 25~F (capacitância). Imediatamente após o pulso, foi adicionado 1~mL de D-Sorbitol 1~M estéril, 4° C.

As células foram semeadas em placas MM ágar [meio mínimo contendo metanol 2% (v/v), sem histidina] e MD ágar [meio mínimo contendo glicose 2% (m/v), sem histidina], e as leveduras transformantes His^+Mut^+ e His^+Mut^- foram identificadas após 3 dias de incubação a 30°C. O vetor pPIC9K possui diferentes sítios de clivagem para cada estratégia de integração, assim a integração do genoma exógeno a levedura ocorre por recombinação homóloga dupla, uma vez que o vetor está linearizado. Como produto da digestão do plasmídeo pela enzima BgIII há a substituição do gene aox1 pelo gene pvcsall_{FL} gerando leveduras com o fenótipo His^+Mut^- ou His^+Mut^+ . A diferenciação entre os fenótipos ocorreu por observação de crescimento na placa MM ágar, na qual apenas o fenótipo His^+Mut^+ é capaz de se desenvolver. A não substituição de aox1, digestão com SaII, preserva o fenótipo selvagem His^+Mut^+ . A seleção dos clones para expressão pela avaliação da

resistência destes ao antibiótico geneticina (G418, Sigma-Aldrich USA Co. LLC) nas concentrações finais de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL em meio YPD ágar.

3.1.1.3 Estabelecimento das condições de expressão e purificação de $yPvCSAII_{FL}$

Para os experimentos de expressão em escala piloto (pequena escala) foram seguidas as orientações do pPIC9K, A Pichia Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression, guide version G (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) e o protocolo padronizado por nosso grupo (VICENTIN et al., 2014). Assim, os clones transformantes foram cultivados durante 24 horas, 28-30°C, 230 rpm, em 10 mL de meio BMGY [1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 100 mM KH₂PO₄ (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda., Diadema, SP), 0,34% (m/v) base nitrogenada de levedura (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.), 1% (m/v) sulfato de amônio (Sigma-Aldrich USA Co. LLC), 4x10⁻⁵% (m/v) biotina (Gibco, Life Technologies Corporation USA Inc.) e 3% (m/v) glicerol (Sigma-Aldrich USA Co. LLC)]. Após este período, as células foram recolhidas por centrifugação, 2.465 x g, por 5 minutos, T.A., solubilizadas em 2 mL de meio BMMY [1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 100 mM KH₂PO₄, 0,34% (m/v) base nitrogenada de levedura, 1% (m/v) sulfato de amônio, 4x10⁻⁵% (m/v) biotina e 0,5 % (v/v) metanol (álcool metílico, Merck KGaA DEU Inc.)] e cultivadas por mais 72 horas. A indução foi mantida pela adição de metanol absoluto estéril na concentração final de 1%, a cada 24 horas de manutenção da cultura. Depois de verificada a expressão de yPvCSAll_{FL} por SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie, confirmada por immunoblotting utilizando anticorpos monoclonais, o clone His Mut de yPvCSAll_{FL} selecionado foi submetido a diferentes condições de expressão para otimizar sua expressão.

Foi variado nos ensaios o volume de meio de cultura indutor (BMMY) em relação ao volume de meio de cultura repressor (BMGY) em 0,2X, 1,0X, 5,0X e 10,0X, o tempo de duração do cultivo após o início da indução de 24-96 horas e o volume de indutor

(metanol) utilizado de 0,5-2%. Dentre as condições avaliadas, a expressão de yPvCSAll_{FL} foi padronizada utilizando meio BMMY concentrado (0,2X) em relação ao volume de meio BMGY, dispensando uma etapa de concentração por ultrafiltração, com indução mantida pela presença de metanol estéril na concentração final de 1%, por um período total de 72 horas.

A purificação de yPvCSAll_{FL} foi realizada em 2 etapas cromatográficas, afinidade e troca iônica. Inicialmente o sobrenadante contendo a proteína solubilizada foi submetido à cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de níquel HisTrap™FF (GE Healthcare USA Inc., Pittsburgh, PA) acoplada ao sistema FPLC ÄKTA prime plus (GE Healthcare USA Inc.). A eluição ocorreu contra um gradiente de imidazol (15-400 mM, USB, Affymetrix USA Inc., Santa Clara, CA) em tampão fosfato-cloreto [20 mM NaH₂PO₄ (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.), 20 mM Na₂HPO₄ (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.), 0,5 M NaCl (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.), pH=6,0].

As frações contendo a proteína recombinante quimérica, identificadas em SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie, foram dialisadas em membrana SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing 10.000 MWCO (Thermo Fisher Scientific USA Inc., Waltham, MA) contra 20 mM Tris-HCI, (pH=8,0). Após a diálise, yPvCSAll_{FL} foi filtrada (0,45 μm) e submetida a uma etapa de purificação por cromatografia de troca iônica, utilizando a Coluna HiTrap™QFF (GE Healthcare USA Inc.), também acoplada ao sistema ÄKTA. A eluição das proteínas ocorreu com um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl em relação ao tampão 20 mM Tris-HCl (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.). As frações contendo a proteína recombinante quimérica foram então dialisadas contra tampão fosfato-salino (PBS, do inglês phosphate-buffered saline) [8 mM NaH₂PO₄, 2,3 mM Na₂HPO₄, 130 mM NaCl, pH=7,4] 16-18 horas, sob constante agitação, a 4°C.

A determinação da concentração de y*Pv*CSAll_{FL} foi realizada por análise de predição, utilizando o *software* ImageQuant™ TL versão 8.1 (GE Healthcare USA Inc.), utilizando como base comparativa uma curva de calibração com concentrações definidas de albumina de soro bovino (ASB, Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.).

3.1.2 Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1)

A proteína recombinante que representa o ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax* (yPvAMA-1) foi expressa segundo protocolo padronizado e descrito recentemente por nosso grupo (VICENTIN et al., 2014). Brevemente, a recombinante foi obtida por expressão secretada em leveduras *P. pastoris*, cepa GS115 (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) a partir de gene sintético códon optimizado obtido comercialmente (GenScript USA Inc.) e subclonado no vetor pPIC9K. O gene, depositado no GenBank sob o número de acesso KJ010958, representa a sequência de nucleotídeos correspondente aos aminoácidos 43 a 487. A proteína solúvel, assim como yPvCSAll_{FL} foi purificada por duas etapas cromatográficas e quantificada utilizando o *software* ImageQuant™ TL (GE Healthcare USA Inc.).

3.1.3 Caracterização biofísica e bioquímica das proteínas yPv

As proteínas recombinantes y*Pv*CSAll_{FL} e y*Pv*AMA-1 foram caracterizadas por SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie, *immunoblotting* [utilizando anticorpos monoclonais anti-His (GE Healthcare USA Inc.), anti-*Pv*AMA-1-DII (GENTIL et al., 2010), anti-*Pv*CSP-VK210 (2F2) (NARDIN et al., 1982), anti-*Pv*CSP-VK247 (2E10.E9) (COCHRANE, dados não publicados)], sob condições redutoras, bem como por ensaios de RP-HPLC (JIMENEZ et al., 2008), dicroísmo circular (BÖHM; MUHR; JAENICKE, 1992; JIMENEZ et al., 2008; RAMOS et al., 2004) e estabilidade acelerada (FABER et al., 2013).

3.1.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

As eletroforeses foram realizadas de acordo com protocolos estabelecidos pelo grupo. Os géis de empilhamento foram obtidos utilizando 3% de acrilamida/bisacrilamida, a partir das soluções estoque [12% (m/v) acrilamida (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.), 1,2% (m/v) bis-acrilamida (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) e 0,25 mM Tris (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.), 0,2% (m/v) dodecil sulfato de sódio (SDS, Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.)] e polimerizados utilizando 0,1% (m/v) de persulfato de amônio (Sigma-Aldrich USA Co. LLC) e 12 μL de TEMED (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) para 5 mL de solução final. Os géis de separação foram obtidos utilizando 12% ou 15% de acrilamida/bis-acrilamida, 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 0,1% (m/v) de persulfato de amônio e 12 μL de TEMED para 9 mL de solução final.

As eletroforeses foram realizadas a 140 V em solução tampão Tris-glicina (35 mM SDS, 160 mM glicina (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.), 25 mM Tris-HCl). Os géis foram corados em solução corante [1% (m/v) Coomassie blue R250 (USB Affymetrix USA Inc.), 45% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.)] e descorados com solução descorante [45% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido acético glacial]. As amostras foram preparadas em tampão de amostra [concentração final: 2,5% (m/v) glicerol, 4% (m/v) SDS, 25 mM 2-mercaptoetanol (Bio-Rad Laboratories USA Inc.), 12,5 mM Tris-HCl e 0,025 mM azul de bromofenol (Bio-Rad Laboratories USA Inc.)] e aquecidas a 97°C por 2 minutos.

3.1.3.2 Immunoblotting

As proteínas recombinantes foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 12% conforme descrito anteriormente, e após esta, as amostras separadas no gel de acrilamida/bis-acrilamida foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose Hybond N (GE Healthcare USA Inc.) em tampão de transferência [160 mM glicina, 25 mM Tris e 20% (v/v) metanol] a 101 V por 1 hora, utilizando o sistema de transferência úmida Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories USA Inc.). As membranas foram coradas com solução Ponceau-S [0,1% Ponceau red (Bio-Rad Laboratories USA Inc.) e 10% ácido acético] para confirmação da transferência, e em seguida foram incubadas por 16-18 horas, 4°C, em solução de bloqueio [5% (m/v) leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé CHE S.A., Vevey, VD), 2,5% (m/v) albumina sérica bovina] em PBS.

Após este período, as membranas foram incubadas por 1 hora a T.A., com os anticorpos primários mencionados anteriormente [anti-His 1:1.000, (v/v)], anti-PvCSP-VK210 (2F2) e anti-PvCSP-VK247 (2E10.E9) 1:100 (v/v) ou anti-PvAMA-1-DII [clones K₂14, K₂39, K₂43, K₂68 e K₂72 1:500, (v/v)], sob condições reduzidas por 2-mercaptoetanol e não reduzidas. Após 3 lavagens de 10 minutos com PBS-T [0,05% Tween 20, (v/v), Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.], a membrana foi incubada com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories USA Inc., Gaithersburg, MA) diluído 1:1.000 em solução de bloqueio por 1 hora a T.A. Após 3 lavagens com PBS-T, a revelação por quimioluminescência, utilizando kit ECL Western Blotting Analyses System (GE Healthcare USA Inc.) ocorreu, em sala escura, expondo a membrana ao filme fotográfico (GE Healthcare USA Inc.) e este às soluções de revelação e fixação (Eastman Kodak USA Co., Rochester, NY).

3.1.3.3 Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) das yPv

As proteínas recombinantes yPvCSAll_{FL}, e yPvAMA-1 purificadas, foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) utilizando uma coluna C4 Vydac (4,6 mm × 250 mm, para partículas de 300 Hm) em um sistema HPLC Shimadzu LC Solution (Shimadzu JPN Corp., Kyoto, KY). O procedimento foi realizado no Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil) graças à colaboração estabelecida com a Dra. Isabel de Fátima Correia Batista e o Dr. Rafael Marques Porto, e utilizou um gradiente de acetonitrila (Merck KGaA DEU Inc.) de 0-100% em 0,1% de acido trifluoracético (TFA, Thermo Fisher Scientific USA Inc.) / 90% acetonitrila a aproximadamente 24°C, sob um fluxo de 1 mL/minuto por 40 minutos. A eluição foi monitorada com um detector de absorbância UV–visível (Shimadzu SPD M20A, Shimadzu JPN Corp.) a 214 nm (JIMENEZ et al, 2008).

3.1.3.4 Espectroscopia das yPv

Os ensaios de dicroísmo circular (DC) foram realizados no espectropolarímetro JASCO-J810 (Jasco ITA Corp., Milano, MI) equipado com um sistema de controle de temperatura contínuo da Central Analítica (CA) do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil). As proteínas recombinantes yPvCSAII_{FL} e yPvAMA-1, acondicionadas em uma cubeta de quartzo de 5 mm, sofreram 10 scans UV realizados na velocidade de 20 nm/minuto, entre os comprimentos de onda 260–200 nm com 1 nm de bandwidth para respostas de 1 segundo, a 20°C (JIMENEZ et al., 2008; RAMOS et al., 2004). Os espectros foram corrigidos subtraindo o sinal do tampão (PBS) e a elipticidade molar (θ) foi calculada para predição das estruturas secundárias das proteínas recombinantes utilizando o

software CDNN Secundary Structure Analysis (Applied Photophysics GBR Ltd., Leatherhead, SU) (BÖHM; MUHR; JAENICKE, 1992).

3.1.3.5 Análise da estabilidade das proteínas yPv

A estabilidade das proteínas recombinantes yPv foi avaliada submetendo alíquotas de cada proteína recombinante à incubação de 37°C por 5 dias (FABER et al., 2013) seguida por SDS-PAGE 12%, corado com azul de Coomassie.

3.2 Obtenção e caracterização das proteínas expressas em bactérias *E. coli* (b*Pv*)

3.2.1 Variantes alélicas individuais de PvCSP

3.2.1.1 Gene sintético das bPvCSP

Os plasmídeos correspondentes as b*Pv*CSP, construções proteicas *full lenght* de cada uma das variantes alélicas de *Pv*CSP e a uma quimérica que fusiona os 3 *repeats* centrais, foram cedidos pelo Prof. Maurício Martins Rodrigues da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP, São Paulo, SP, Brasil). As proteínas recombinantes foram denominadas (His₆)-*Pv*CSP-VK210, (His₆)-*Pv*CSP-VK247, (His₆)-*Pv*CSP-*P. vivax-like* e (His₆)-*Pv*CSP-All (TEIXEIRA et al., 2014), porém para

facilitar, neste trabalho serão mencionadas como b*Pv*CSP-VK210, b*Pv*CSP-VK247, b*Pv*CSP-*P. vivax-like* e b*Pv*CSP-All. Brevemente, os genes sintéticos gerados comercialmente (GenScript USA Inc.) contendo as regiões imunodominantes da proteína CS foram códon optimizados para expressão em bactérias *E. coli*. Os genes foram subclonados em vetor de expressão pET-28a [Novagen, Merck KGaA DEU Inc., (Figura 9)] e transformados em cepas *E. coli* BL21 DE3 (Merck KGaA DEU Inc.) para expressão sob indução de IPTG.

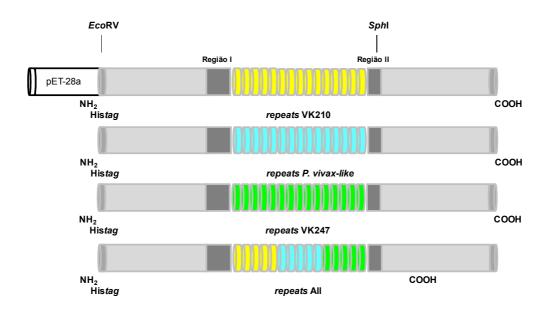


Figura 9 - Representação esquemática da fase de leitura aberta das sequências das variantes alélicas de *Pv*CSP presentes no vetor pET-28a para expressão em bactérias *E. coli.* Em amarelo a sequência de *repeats* da variante de *Pv*CSP VK210, em azul de *P. vivax-like* e em verde de VK247.

3.2.1.2 Expressão, purificação e caracterização bioquímica das bPvCSP

Para a expressão em média escala, os clones selecionados em expressão piloto, foram cultivados durante 16-18 horas, 37°C, 200 rpm, em 20 mL de meio LB (Luria Broth, Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) contendo canamicina (30 mg/mL, Sigma-Aldrich USA Co. LLC). Após este primeiro período de cultura, 300 mL

de meio LB com canamicina foram semeados com 200 μ L do pré-inóculo e mantidos sob agitação (200 rpm, 37°C) até obtenção de DO₆₀₀ 0,6-0,8. A cultura foi então induzida com 0,1 mM de isopropil β -D-1-tiogalactopiranoside (IPTG, Life Technologies Corporation USA Inc.), e após 4 horas, as células foram recolhidas por centrifugação (2.465 x g, 40 minutos, 4°C) e solubilizadas em tampão fosfato-cloreto [NaH₂PO₄ (50 mM) (m/v), NaCl (300 mM) (m/v), 1 mg/mL de lisozima (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) e PMSF 1 mM (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc., pH=8,0).

O homogenato de cultura recebeu pulsos ultrassônicos de 60 segundos com intervalo de 10 segundos, utilizando 50% de amplitude, a fim de romper as células e liberar as proteínas (Digital Sonifier® Cell Disruptor, Branson Ultrasonics USA Corp., Danbury, CT). Ao final do ultrassom, as células foram recolhidas por centrifugação, dispensadas, e o sobrenadante recolhido submetido a um tratamento com ureia 8 M (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) visando otimizar a purificação. A mistura foi mantida sob agitação constante por 2 horas a T.A., para então ser submetida a aquecimento a 100°C por 10 minutos e, finalmente, adição de 5 mL de resina Ni-NTA (GE Healthcare USA Inc.) equilibrada com o tampão fosfato-cloreto, mesmo utilizado no processo de sonicação.

Após incubação de 16-18 horas, sob agitação constante, 4°C, a resina foi recuperada por centrifugação (2.000 rpm, 10 minutos, 4°C), lavada com concentrações decrescentes de ureia (8, 6, 4, 2 e zero M) em tampão fosfato-cloreto-glicerol [(NaH₂PO₄ (50 mM) (m/v), NaCl (300 mM) (m/v), 10% de glicerol, pH=8,0)] e as proteínas eluídas em tampão de eluição [(30 mL tampão fosfato-cloreto-glicerol, imidazol (500 mM) (m/v), 600 μL de PMSF (100 mM) (v/v), pH=8,0)]. As frações que continham as proteínas b*Pv*CS foram reunidas e dialisadas em membrana para diálise, sob agitação constante, 16-18 horas a 4°C contra PBS. Para a determinação das concentrações foi utilizado o *software* de predição ImageQuant™ TL, tendo como base comparativa uma curva de calibração com concentrações definidas de ASB.

A expressão de b*Pv*CSP-VK210, b*Pv*CSP-VK247, b*Pv*CSP-*P. vivax-like* e b*Pv*CSP-All foi verificada por SDS-PAGE 12%, corado com azul de Coomassie e confirmada por *immunoblotting*, utilizando anticorpos monoclonais anti-His (1:1.000), anti-*Pv*CSP-VK210 (1:100) e anti-*Pv*CSP-VK247 (1:100).

3.2.2 Repeats das variantes alélicas individuais de *Pv*CSP fusionados a flagelina FliC de *Salmonella entérica* serovar Thyphimurim

Alíquotas das proteínas (His)-FliC-*Pv*CSP-*repeats* purificadas foram cedidas pelo Prof. Maurício Martins Rodrigues. As proteínas de fusão recombinantes correspondentes aos *repeats* das variantes individuais de *Pv*CSP fusionados a flagelina (FliC) de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium foram geradas conforme descrito previamente (BARGIERI et al., 2008; CAMACHO et al., 2011; LEAL et al., 2013). Brevemente, os genes sintéticos obtidos comercialmente (GenScript USA Inc.) contendo as regiões os *repeats* centrais das 3 variantes alélicas da proteína *Pv*CS foram códon optimizados para expressão em bactérias *E. coli* e subclonados em vetor de expressão pET-28a para expressão sob indução de IPTG (Figura 10).

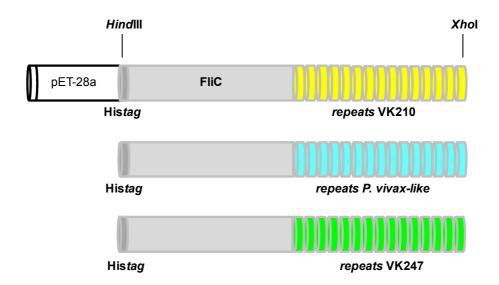


Figura 10 - Representação esquemática da fase de leitura aberta das sequências de repeats das variantes alélicas de PvCSP fusionados a flagelina FliC presentes no vetor pET-28a para expressão em bactérias E. coli. Em amarelo a sequência de repeats da variante de PvCSP VK210, em azul de P. vivax-like e em verde de VK247.

3.3 Análise da imunogenicidade em camundongos

3.3.1 Animais

Após aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em 02 de julho de 2012 (Protocolo CEUA/FCF/362), os ensaios biológicos para avaliar a resposta imune foram iniciados. Os procedimentos foram realizados nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, em ambiente apropriado, com temperatura, luz e umidade controladas. Foram utilizados camundongos fêmeas de 6-8 semanas isogênicos, das linhagens BALB/c (H-2^d) e C57BL/6 (H-2^b), com pesos entre 20-25 g, obtidos dos biotérios de experimentação do ICB/USP e do IQ/USP. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inoxidável, contendo maravalha previamente esterilizada, a qual foi trocada rotineiramente ao longo da permanência dos animais.

3.3.2 Imunizações experimentais

Os grupos experimentais (Tabela 1) foram compostos por 6 camundongos. Os animais receberam 3 doses de 10 µg das proteínas recombinantes yPvCSAll_{FL} e yPvAMA-1, isoladas ou em combinação equimolar (Mix), na presença de 50 µg do adjuvante ácido poli-inosínico-poli-citidílico de elevada massa molecular [Poly(I:C) HMW], num volume final de 0,1 mL, com intervalo de 15 dias. Os grupos controles foram compostos por animais imunizados apenas com o adjuvante ou apenas as proteínas recombinantes purificadas, dissolvidas em PBS.

Tabela 1 - Descrição dos grupos animais submetidos às imunizações experimentais.

Grupos Experimentais

PBS + Poly(I:C)

PBS + yPvCSAII_{FL}

PBS + yPvAMA-1

PBS + Mix

yPvCSAII_{FL} + Poly(I:C)

yPvAMA-1 + Poly(I:C)

Mix + Poly(I:C)

As imunizações foram realizadas por via subcutânea (s.c.) nas 2 patas traseiras (primeira dose) ou base da cauda (reforços subsequentes) e as coletas de sangue foram realizadas 14 dias após cada uma das 3 doses das formulações vacinais, e mensalmente da quinta a décima sexta sangria. Ao final, os animais foram acompanhados por um período de 420 dias, permitindo avaliar, desta forma, a longevidade dos anticorpos IgG induzidos (Figura 11). Todos os soros foram recolhidos por centrifugação e estocados a -20°C até sua utilização.

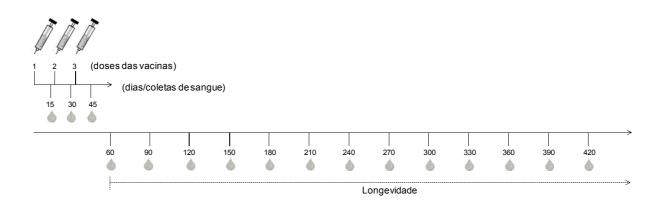


Figura 11 - Representação esquemática da vacinação, coleta de sangue e análise da longevidade de anticorpos IgG induzidos.

3.3.3 Dosagem de anticorpos IgG e isotipos de IgG induzidos pelas imunizações experimentais em camundongos

Placas de 96 poços modelo *high binding costar* 3590 (Corning, Sigma-Aldrich USA Co. LLC, St Louis, MO) foram sensibilizadas com 100 ng da proteína homóloga yPvAMA-1, 200 ng de cada uma das proteínas recombinantes PvCS [proteína homóloga yPvCSAII_{FL}, ou as (His₆)-PvCSP- (VK210, VK247 ou *P. vivax-like*), ou ainda as FliC-PvCSP-repeats (VK210, VK247 ou *P. vivax-like*)] em tampão carbonato-bicarbonato [Na₂CO₃ (0,01 M), NaHCO₃ (0,03 M), (pH=9,6)]. Essas concentrações foram ajustadas de modo que todas as proteínas fossem reconhecidas de forma semelhante pelo anticorpo monoclonal anti-His. As placas foram incubadas 16-18 horas a T.A., e após esse período, lavadas 3 vezes com PBS-T seguidas da adição de 200 μL/poço de solução leite-ASB-PBS [leite desnatado (5%) (m/v), ASB (2,5%) (m/v), PBS, (pH=7,4)], 2 horas a 37°C, para bloqueio dos sítios inespecíficos.

O soro recolhido dos camundongos foi testado em diluições seriadas, a partir de 1:100, em um volume de 50 μ L, seguido por uma incubação de 1 hora, T.A.. Após 3 lavagens com PBS-T, foram adicionados 50 μ L/poço do anticorpo secundário de camundongo anti-IgG conjugado a peroxidase (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories USA Inc.), diluído 1:3.000 em solução de bloqueio, 1 hora a T.A., com posterior lavagem com PBS-T por 3 vezes. A reação enzimática ocorreu pela adição de 1 mg/mL de o- ρ -fenilenediamina (OPD, Sigma-Aldrich USA Co. LLC) e 0,1% (v/v) [Merck KGaA DEU Inc.] de H_2O_2 diluídos em tampão fosfato-citrato [200 mM Na $_2$ HPO $_4$ (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.), 218 mM $C_6H_8O_7$ (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.); pH=4,8-4,9], interrompida pela adição de 50 μ L de H_2SO_4 4N (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.) e as D.O. $_{492}$ determinadas.

A detecção de anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3 anti-yPvCSAll_{FL} e anti-yPvAMA-1 nos camundongos imunizados foi realizada como descrito acima, exceto que o anticorpo secundário foi substituído por anticorpos isotipo-específicos de camundongo (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG2c e anti-IgG3) conjugados

a peroxidase (Southern Technologies USA Corp., Lake Charles, LA) em uma diluição de 1:8.000. Os títulos de anticorpos específicos foram definidos como a maior diluição com uma D.O. $_{492}$ superior a 0,1. Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos em $\log_{10} \pm$ erro padrão da média (SEM).

3.3.4 Determinação da avidez dos anticorpos IgG induzidos pelas imunizações experimentais

Para comparar a avidez dos anticorpos induzidos pelas construções quiméricas de PvCSP [em sistema bacteriano e em sistema eucarioto de expressão] placas de 96 poços modelo high binding costar 3590 foram sensibilizadas com 200 ng de cada uma das proteínas recombinantes em tampão carbonato. Cada placa teste recebeu uma placa espelho, a qual foi submetida a tratamento desnaturante. As placas foram incubadas 16-18 horas, T.A., e após esse período, lavadas 3 vezes com PBS-T seguidas da adição de 200 µL/poço de solução de bloqueio leite-ASB-PBS, 2 horas, 37°C. Os soros coletados foram testados na diluição de 1:12.800, em um volume final de 50 μL, seguido por uma incubação de 1 hora a T.A. Após 3 lavagens com PBS-T, as placas espelho receberam solução de ureia 6M em PBS-T em um volume de 200 µL/poço e permaneceram em contato com a solução por 30 minutos a T.A.. Após o período de tratamento desnaturante, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e 50 µL/poço do anticorpo secundário de camundongo conjugado a peroxidase diluído em solução de bloqueio foi adicionado, 1 hora, T.A., com 3 posteriores lavagens com PBS-T. A reação enzimática ocorreu pela adição de 1 mg/mL de $o-\rho$ -fenilenediamina (OPD) e 0,1% (v/v) de H_2O_2 diluídos em tampão fosfato-citrato, interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 4N e as D.O.₄₉₂ determinadas. A porcentagem de avidez foi definida como (D.O.492/630 com tratamento) / (D.O. $_{492/630}$ sem tratamento) x 100%.

3.3.5 Análise da resposta celular

3.3.5.1 Obtenção das células esplênicas

Camundongos submetidos às vacinações foram eutanasiados com o auxílio de uma câmara de CO2. Dentro do fluxo laminar, imediatamente após a verificação da ausência de sinais vitais dos animais, os baços foram retirados com o auxílio de pinça e tesoura estéreis e transferidos para separadores celulares cell strainer (BD Biosciences USA Inc., San Carlos, CA), apoiados em placa de petri estéril contendo 5 mL de meio RPMI 1640 [RPMI 1640 (1,04%) (m/v) (Sigma-Aldrich USA Co. LLC), HEPES [ácido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfônico] (0,24%) (m/v) Gibco, Life Technologies Corporation USA Inc., NaHCO₃ (0,2%) (m/v) (Sigma-Aldrich USA Co. LLC), estreptomicina (133 µg/mL, Sigma-Aldrich USA Co. LLC), penicilina (59 µg/mL, Sigma-Aldrich USA Co. LLC), em H₂O MilliQ, (pH=7,2-7,4)], para então serem gentilmente macerados e as células recuperadas por centrifugação (300 x g, 5 minutos, 4°C). As hemácias foram lisadas com a adição de 1 mL/baço de tampão hemolítico [NH₄Cl (0,15M) [Sigma-Aldrich USA Co. LLC], KHCO₃ (1 mM) [Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.], Na₂EDTA (0,1 mM) [Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.], em H₂O MilliQ, (pH= 7,2-7,4)], o qual agiu por 2 minutos. Após o período de incubação, para cessar a ação hemolítica, foi realizada nova centrifugação, nas condições acima mencionadas. O procedimento de lavagem foi repetido e o sedimento celular foi finalmente ressuspendido em 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado [0,055 mM 2-mercaptoetanol (Gibco, Life Technologies Corporation USA Inc.), 2 mM L-glutamina (Gibco, Life Technologies Corporation USA Inc.), 1 mM piruvato de sódio (Gibco, Life Technologies Corporation USA Inc.), 1% (v/v) vitaminas-MEM (Gibco, Life Technologies Corporation USA Inc.), 1% (v/v) aminoácidos não essenciais MEM- NEAA (Gibco, Life Technologies Corporation USA Inc.) e 10% de soro bovino fetal, RPMI 1640]. O homogenato foi diluído em corante vital azul de Trypan (0,4% (v/v), Gibco, Life Technologies Corporation USA Inc.) e as células foram contadas, utilizando uma câmara de Neubauer (LO, Laboroptik UK Ltd, Lancing Business Park, LA).

3.3.5.2 Proliferação de células T

Foram marcadas 50x10⁶ células com 1,25 μM éster succinimidil carboxi-fluoroscein-diacetato (CFSE, Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) diluído em PBS, 37°C. O excesso do corante foi removido por centrifugação e o sedimento celular ressuspendido em meio RPMI 1640 e nova contagem realizada. As células foram diluídas para a concentração de 3x10⁵/poço, e o plaqueamento foi efetuado em placas de 96 poços com fundo em "U" modelo *binding costar* 3799 (Corning Incorporated USA Inc.), na presença de estímulos esterilizados por 200 Gy de irradiação utilizando o irradiador de cobalto-60 modelo GammaCell-220 (IPEN, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, Brasil) [10 μg/mL de proteínas recombinantes, 26 μg/mL do *pool* de peptídeos sintéticos com regiões sobrepostas (15 mers) que cobrem toda a extensão das regiões N-terminal e C-terminal de *Pv*CSP (GenScript USA Inc., Piscataway, NJ) ou 2,5 μg/mL do mitógeno Concanavalina A (Con A, Sigma-Aldrich USA Co. LLC)]. A incubação em estufa a 5% de CO₂ durou 5 dias, e após este período, as células foram recolhidas por centrifugação.

As células foram marcadas com os anticorpos/fluorocromos (BD Biosciences USA Inc.) diluídos em tampão MACS [ASB (0,5%) (m/v), EDTA (2 mM), PBS, (pH=7,2-7,4)] de acordo com o descrito na Tabela 2, e após 1 lavagem com tampão MACS, as células foram adquiridas por citometria de fluxo no citômetro FACSCantoII™ (BD Biosciences USA Inc.). A análise dos eventos foi realizada através do *software* FlowJo versão 9.3.3 (Tree Star USA Inc., Ashland, OR). Os resultados foram expressos em porcentagem de células proliferando, cálculo que consiste na subtração dos valores dos grupos imunizados com as proteínas recombinantes e reestimulados dos do grupo controle das imunizações.

Tabela 2 - Fluorocromos utilizados nos experimentos de citometria de fluxo.

	Marcador	Diluição	Tipo de marcação
PercP-CY5.5	CD4	1:100	Superfície
PE-CY7	CD8	1:100	Superfície
APC-CY7	CD3	1:50	Superfície

3.3.5.3 Dosagem de IFN-γ por ELISPOT

No dia anterior à eutanásia dos animais e início da cultura, placas de nitrocelulose de 96 poços modelo MAHAS4510 (Millipore, Merck KGaA DEU Inc.) foram sensibilizadas com 10 μg/mL do anticorpo de captura monoclonal, R4 anticamundongo IFN-γ (BD Biosciences USA Inc.), diluído em PBS estéril. Os poços foram cobertos com 60 μL da diluição, e as placas mantidas por incubação 16-18 horas, T.A.. Após incubação, o anticorpo foi removido por aspiração e as placas lavadas 3 vezes com 100 μL de meio RPMI 1640. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com meio R10 [soro bovino fetal (10%) (v/v) Gibco, Life Technologies Corporation USA Inc., RPMI 1640], 2 horas, 37°C. A solução de bloqueio foi aspirada, e as células esplênicas, obtidas como descrito anteriormente para os ensaios de proliferação, foram adicionadas à placa na concentração de 5x10⁵/poço (em um volume final de 50 μL), assim como os estímulos diluídos em meio RPMI 1640-IL-2 [IL-2 (0,03%) (v/v), RPMI 1640].

Após incubação de 24 horas a 37°C, em estufa com 5% de CO_2 , as células foram descartadas e as placas lavadas 3 vezes com PBS e 5 vezes com PBS-T. O anticorpo de detecção anti-camundongo biotinilado XMG 1.2 (BD Biosciences USA Inc.) diluído em PBS-T (1:200) foi adicionado em um volume final de 75 μ L e uma nova incubação de 16-18 horas a 4°C, ao abrigo da luz foi realizada. Após 6 lavagens com PBS-T, 100 μ L/poço de solução de estreptavidina marcada com peroxidase (BD Biosciences USA Inc.) diluída 1:500 em PBS-T foi adicionado à placa.

Após 2 horas de incubação a T.A., 5 lavagens com PBS-T e 3 com PBS foram realizadas e DAB (3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloreto, Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.,) diluído em água destilada (em um volume final de 100 μL/poço) adicionado. A reação enzimática foi mantida por 15 minutos e interrompida descartando o substrato, e submetendo a placa a lavagem com água corrente em abundância. Após completa secagem das placas, os *spots* foram contados em microscópio óptico.

3.3.5.4 Dosagem de IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A e IL-10 por *Cytometric* Bead Array (CBA)

O sobrenadante da cultura dos esplenócitos foi cuidadosamente recolhido, após 24 horas de contato com os estímulos previamente descritos. A análise e quantificação das citocinas secretadas foram determinadas utilizando o kit *Cytometric Bead Array* Th1/Th2/Th17 para camundongos (CBA, BD Biosciences USA Inc.). Para a aquisição dos eventos foi utilizado o citômetro FACSCantoII™. O kit é composto por *beads* que permitiram a dosagem de interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-17A (IL-17A), interferon gamma (IFN-γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), em comparação a uma curva padrão fornecida pelo fabricante.

Ao sobrenadante de cultura foram adicionadas quantidades equimolares das *beads* de captura de citocinas individuais, e a mistura foi submetida à agitação vigorosa. Em sequência, foi adicionado o reagente de detecção Th1/Th2/Th17 marcado com o fluorocromo PE e uma incubação de 2 horas a T.A., sob o abrigo da luz, foi realizada. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 200 x g, 5 minutos a T.A., o sobrenadante descartado e os sedimentos ressuspendidos em tampão de lavagem fornecido pelo fabricante (*wash buffer*) para aquisição no citômetro (300 mil eventos/amostra). A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* FCAP

Array™ versão 3.0 (Soft Flow, HU Inc., Pécs, BA) e os resultados expressos em pg/mL e % de citocinas secretadas por grupo analisado.

3.4 Análise estatística

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada e todos os dados obtidos testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown-Forsythe) [software IBM SPSS Statistics Standart, IBM, USA Inc., New York, NY]. Constatadas a satisfação das condições para aplicação dos testes estatísticos paramétricos de comparação das médias de amostras independentes, de uma população, subdividida em vários grupos, posteriormente, as comparações foram realizadas pela Análise de Variância Unidimensional (One-Way ANOVA) seguida do teste de Tukey. No conjunto de dados em que não foram observadas distribuição normal e, principalmente, a homogeneidade das variâncias, os testes estatísticos não paramétricos de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis foram adotados para comparação de 2 ou mais grupos, respectivamente. As análises estatísticas realizadas adotaram o nível de significância de 5% (P<0,05). As diferenças entre as proporções de indivíduos respondedores foram analisadas pelo teste Chi-quadrado e as correlações não paramétricas obtidas por Spearman. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad PRISM® versão 5.0 (GraphPad Software, USA Inc., LA Jolla, CA) e os gráficos confeccionados pelo software SigmaPlot® versão 10.0 (GraphPad Software, USA Inc.).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção das proteínas recombinantes em levedura *P. pastoris* (y*Pv*) para a imunização experimental de camundongos

4.1.1 Proteína Circunsporozoíta quimérica (yPvCSAII_{FL})

O plasmídeo pPIC9K-yPvCSAll_{FL} foi utilizado para transformar leveduras metilotróficas *P. pastoris* competentes da linhagem GS115, após linearização com as enzimas de restrição *Sall* e *Bgl*II, conforme protocolo descrito na seção de Materiais e métodos. Os clones de leveduras transformantes *His*⁺, identificadas após 3-4 dias de incubação a 30°C, foram cultivadas por 96 horas sob indução com metanol. Alíquotas recolhidas, imediatamente antes de cada indução realizada, com intervalo de 24 horas, foram submetidas à SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie, no qual foi identificada a expressão da proteína recombinante quimérica após a primeira adição de metanol com padrão de migração em 2 bandas, tendo a majoritária massa molecular aparente de 54 kDa (Figura 12).

A confirmação da expressão de yPvCSAll_{FL} foi realizada por *immunoblotting* utilizando anticorpos monoclonais específicos anti-His, anti-PvCSP-VK210 (2F2) e anti-PvCSP-VK247 (2E10.E9) sob condições reduzidas por 2-mercaptoetanol e não reduzidas (Figura 12A). O reconhecimento da proteína quimérica em ambas as condições infere que os epítopos (VK210 e VK247) que compõem a região central de yPvCSAll_{FL} são lineares e acessíveis ao contato com os anticorpos monoclonais avaliados.

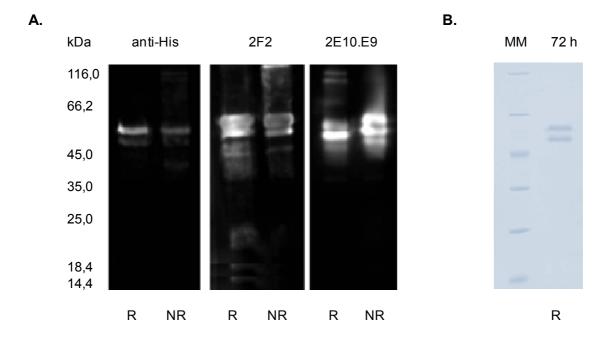


Figura 12 - A proteína recombinante quimérica yPvCSAII_{FL} é expressa de forma solúvel em *P. pastoris*, após 24 horas de indução, com padrão de migração em 54 kDa preservando os 3 epítopos e a cauda de hexa-histidina. O gene sintético códon optimizado pvcsall foi inserido na cepa de levedura *P. pastoris* por eletroporação, e a expressão da proteína quimérica yPvCSAII_{FL} ocorreu sob indução com metanol. O immunoblotting utilizando anticorpos monoclonais específicos anti-His [1:1.000, (v/v)], anti-PvCSP-VK210 (2F2) e anti-PvCSP-VK247 (2E10.E9) [1:100, (v/v)], sob condições reduzidas por 2-mercaptoetanol (R) e não reduzidas (NR), confirmou a expressão da molécula em sua integridade (A.). Clone selecionado por resistência a 2 mg/mL de G418, foi utilizado para expressão em média escala, e a proteína quimérica purificada foi obtida após 2 etapas cromatográficas (B.) MM: Marcador molecular.

Paralelamente a esta primeira expressão foram selecionados clones multicópias resistentes a 2,0 mg/mL do antibiótico G418, os quais foram empregados na otimização das condições de expressão para posterior escalonamento de cultura. Foram avaliados volume de cultura indutor (BMMY) em relação ao de cultura repressor (BMGY), tempo de duração do cultivo e volume de indutor adicionado. Ficaram estabelecidos os parâmetros concentração de BMMY em relação à BMGY (0,2X), 72 horas de cultura com indução diária utilizando 1% de metanol. Após padronização, a cultura inicial foi escalonada para 200 mL (BMMY, média escala) e a proteína quimérica submetida aos processos de purificação por cromatografia de afinidade (Figura 13A) e de troca iônica (Figura 13B), sendo o produto final de elevada pureza, livre de produtos de degradação (Figura 12B) e de elevado

rendimento (7,5-10 mg/L), conforme demonstra o cromatograma de RP-HPLC (Figura 13C), em que assim como os demais há apenas 1 pico único majoritário.

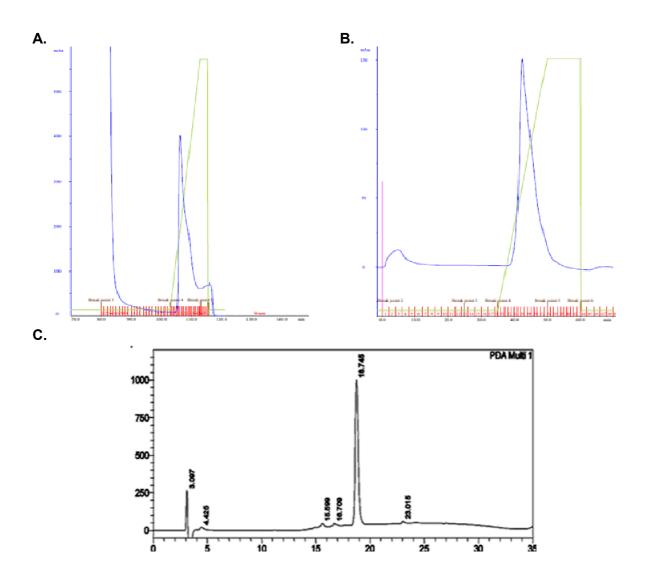


Figura 13 - Os cromatogramas com picos únicos majoritários permitem identificar a proteína recombinante yPvCSAII_{FL} sem produtos de degradação e elevado rendimento, confirmando a pureza final da proteína recombinante. Em (A.) e (B.) estão os cromatogramas gerados pelo sistema ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare USA Inc.) durante o processo de purificação por afinidade em coluna de níquel e troca iônica em coluna catiônica, respectivamente. Em (C.) o cromatograma de RP-HPLC, utilizando um gradiente de eluição combinando tampão "A" [TFA (0,1%) (v/v), água] e "B" [TFA (0,1 %) (v/v), acetonitrila (90%) (v/v)], 24°C, 1 mL/minuto por 40 minutos, em uma coluna C4.

4.1.2 Antígeno 1 de Membrana Apical

A proteína recombinante yPvAMA-1 foi obtida seguindo o protocolo previamente estabelecido pelo grupo (VICENTIN et al., 2014). Os cromatogramas de purificação por cromatografia de afinidade (Figura 14A) e troca iônica (Figura 14B) apresentaram pico único, assim como visualizado para yPvCSAII_{FL}, caracterizando produto final de elevada pureza, sem produtos de degradação, conforme cromatograma de RP-HPLC (Figura 14C), com rendimento de 7,5-10 mg/mL (Figura 14D), o qual foi reconhecido por anticorpos monoclonais específicos contra a cauda de hexa-histidina (anti-His) e contra o domínio II [K₂14, K₂39, K₂43, K₂68 e K₂72, (Figura 14E)].

4.2 Caracterização biofísica e bioquímica das proteínas yPv

A fim de complementar as análises de *immunoblotting*, ensaios de RP-HPLC, dicroísmo circular e estabilidade acelerada foram realizados para caracterizar as proteínas yPv produzidas para a realização deste trabalho. Os ensaios de *immunoblotting* confirmaram a expressão de yPvCSAll_{FL} e yPvAMA-1, através do reconhecimento de epítopos presentes nas regiões centrais da proteína pré-eritrocítica (repeats VK210 e VK247) e no domínio II do ectodomínio de AMA-1, além da cauda de hexa-histidina inserida em ambas as construções (Figuras 5 e 6A). Estes ensaios permitiram ainda verificar um reconhecimento similar da região central de yPvCSAll_{FL} em condições redutoras e não redutoras, inferindo que os epítopos presentes nesta região da proteína quimérica não são conformacionais e estão acessíveis ao contato com os anticorpos (Figura 12A), resultado também observado com yPvAMA-1 na presença dos 5 diferentes monoclonais direcionados para o seu domínio II (Figura 14E).

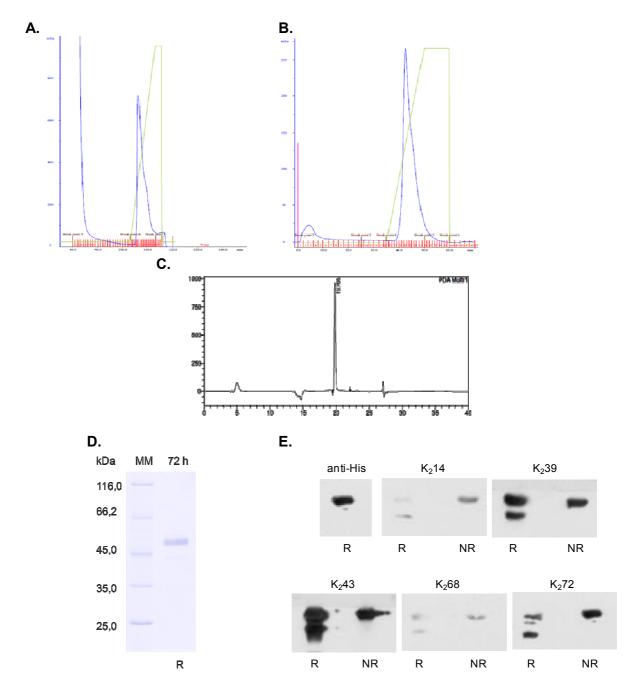


Figura 14 - A proteína recombinante yPvAMA-1 expressa em *P. pastoris* possui padrão de migração em 53 kDa e é reconhecida por anticorpos monoclonais específicos. O gene sintético códon optimizado *pv*ama-1 foi inserido na cepa de levedura *P. pastoris* por eletroporação, e a expressão da proteína ocorreu sob indução com metanol. Em (A.) e (B.) estão os cromatogramas gerados pelo sistema ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare USA Inc.) durante o processo de purificação por afinidade em coluna de níquel e troca iônica em coluna catiônica, respectivamente. Em (C.) o cromatograma de RP-HPLC, utilizando um gradiente de eluição combinando tampão "A" [TFA (0,1%) (v/v), água] e "B" [TFA (0,1 %) (v/v), acetonitrila (90%) (v/v)], 24°C, 1 mL/minuto por 40 minutos, em uma coluna C4. O SDS-PAGE 12%, corado com azul de Coomassie, mostra a proteína purificada (D.), e os *immunoblotting* utilizando anticorpos monoclonais específicos anti-His [1:1.000, (v/v)], anti-AMA-1-DII-K₂14, anti-AMA-1-DII-K₂39, anti-AMA-1-DII-K₂43, anti-AMA-1-DII-K₂68 e anti-AMA-1-DII-K₂72 [1:500, (v/v)], sob condições reduzidas por 2-mercaptoetanol (R) e não reduzidas (NR), confirmaram a expressão da molécula em sua integridade (E.). MM: Marcador molecular.

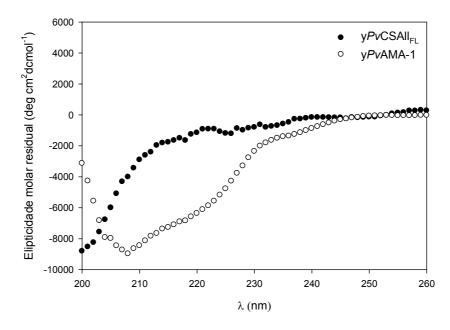


Figura 15 - As proteínas recombinantes yPvCSAII_{FL} e yPvAMA-1 apresentam predomínio de fitas β, porém apenas o espectro DC de yPvAMA-1 corresponde ao de uma proteína enovelada. O espectro de dicroísmo circular corresponde ao sinal espectroscópico das yPv, com um comprimento de onda variando de 200 a 260 nm, deconvoluído pelo software CDNN Secundary Structure Analysis (Applied Photophysics).

Dados mais consistentes sobre a conformação dessas moléculas foram obtidos por espectroscopia. Os espectros dos ensaios de dicroísmo circular (Figura 15) foram deconvoluídos utilizando o programa CDNN Secundary Structure Analysis, e as percentagens de α -hélix, outras estruturas (antiparalelas, paralelas e fitas β), e random coil estimadas. O espectro DC deconvoluído de yPvCSAll_{FL} predisse 13,6% de estruturas α -hélix, 59,8% de outras estruturas e 48,7% de estruturas random coil, percentagens similares aos de outras 2 proteínas PfCSP recombinantes analisadas biofisicamente (PLASSMEYER et al., 2009). Após 250 nm, foi observado um sinal muito fraco, o que pode ser associado a um número bastante baixo de estruturas terciárias. O espectro DC de yPvAMA-1 demonstrou predomínio de formas fita β , com pico em 208 nm e as percentagens 12,4% de α -hélix, 62,8% de outras estruturas, e 54,2% de estruturas random coil, como já demonstrado anteriormente por nosso grupo (VICENTIN et al., 2014), resultado consistente com a emissão fluorescente de uma proteína enovelada. A estrutura secundária de yPvAMA-1 é condizente com a estrutura cristalizada da cepa Sall de PvAMA-1, apresentados

anteriormente (PIZARRO et al., 2005). A soma dos elementos das estruturas secundárias calculadas a partir do espectro mostra valores de 104 a 129,4%, mostrando confiança nas medições e deconvoluções.

Paralelamente a análise conformacional, uma vez que as proteínas yPv visam ser empregadas em programas de vacinação em áreas que abrangem regiões de difícil acesso e poucos recursos de infraestrutura, yPvCSAll_{FL} e yPvAMA-1 foram submetidas a teste de estabilidade acelerada (FABER et al., 2013). Após incubação de 5 dias a 37°C, foi verificado em SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie a preservação do padrão de migração de yPvCSAll_{FL}, sem indícios de degradação, e mínima degradação de yPvAMA-1, mostrando elevada estabilidade destas proteínas recombinantes a períodos prolongados sem refrigeração, característica interessante dada suas propostas vacinais (Figura 16).

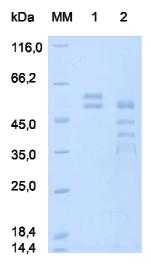


Figura 16 - A proteína recombinante yPvCSAlI_{FL} foi caracterizada como estável a períodos prolongados sem refrigeração, ao contrário de yPvAMA-1. SDS-PAGE 12%, corado com azul de Coomassie, sob condições reduzidas por 2-mercaptoetanol, após incubação de 5 dias a 37°C. (1.) yPvCSAlI_{FL} e (2.) yPvAMA-1.

4.3 Obtenção das variantes alélicas individuais de *Pv*CSP para aplicação na avaliação da especificidade dos anticorpos anti-y*Pv*CSAll_{FL}, ensaio de avidez e análise da resposta celular

Das 4 proteínas b*Pv*CS, Figura 17, 3 foram produzidas para serem empregadas nos ensaios de avaliação da especificidade dos anticorpos induzidos contra y*Pv*CSAll_{FL} assim como para atuarem como estímulos das culturas de esplenócitos. A quarta proteína recombinante, b*Pv*CS-All, foi produzida para ser aplicada na avaliação comparativa da avidez dos anticorpos induzidos por ela, com os anticorpos anti-y*Pv*CSAll_{FL}.

Todas as 4 foram obtidas sem produtos de degradação, com elevado rendimento, 10-30 mg/mL e com padrão de migração de 50,0-55,0 kDa, visualizado em SDS-PAGE corado com azul de Coomassie, em que a proteína b*Pv*CSP-VK210 apresentou o menor tamanho entre as 4, b*Pv*CSP-VK247 migrou de forma similar a quimérica b*Pv*CSP-All, e b*Pv*CSP-*P. vivax-like* mostrou ser a maior entre as 3 variantes de *Pv*CSP (TEIXEIRA et AL., 2014) (Figura 17A).

A confirmação da expressão ocorreu por *immunoblotting* utilizando anticorpos monoclonais. As 4 proteínas recombinantes foram reconhecidas pelo anticorpo contra a cauda de hexa-histidina, enquanto que a proteína correspondente a variante *Pv*CSP-VK210 e a b*Pv*CSP-All pelo anticorpo 2F2, e as proteínas b*Pv*CSP-VK247 e b*Pv*CSP-All pelo 2E10.E9 (Figura 17B). As análises de *immunoblotting* realizadas para confirmar a expressão destas proteínas ficou restrita a esses monoclonais, uma vez que não possuímos um anticorpo monoclonal específico para a variante *P. vivax-like*. Nos ensaios, não foi verificado o reconhecimento cruzado entre os anticorpos monoclonais 2F2 e 2E10.E9 (Figura 17B).

A.

В.

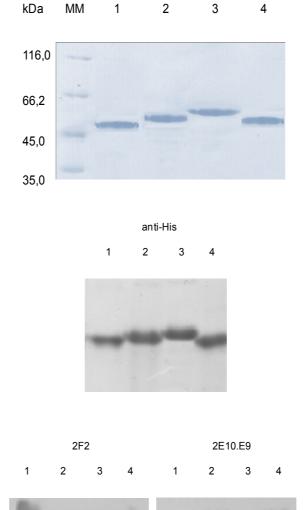


Figura 17 - As sequências *repeats* de cada uma das b*Pv*CSP foram reconhecidas de forma específica confirmando a expressão íntegra das proteínas recombinantes b*Pv*CSP-VK210, b*Pv*CSP-VK247, b*Pv*CSP-*P. vivax-like* e b*Pv*CSP-All. Os genes sintéticos das variantes alélicas de *Pv*CSP foram inseridos no vetor pET-28a e transformados em cepa de BL21 DE3 de bactérias *E. coli.* Clones, selecionados por resistência a canamicina, foram utilizados para expressão sob indução de IPTG e os produtos do ultrassom foram purificados por 2 etapas de cromatografia de afinidade. A expressão das b*Pv*CSP foi verificada por SDS-PAGE 12% corado com azul de Coomassie e confirmada por *immunoblotting* utilizando anticorpos monoclonais específicos anti-His (1:1.000, v/v), anti-*Pv*CSP-VK210 (2F2) e anti-*Pv*CSP-VK247 (2E9.E10) [1:100, v/v], sob condições reduzidas por 2-mercaptoetanol. **MM**: Marcador molecular. (1.) b*Pv*CSP-VK210, (2.) b*Pv*CSP-VK247, (3.) b*Pv*CSP-*P. vivax-like* e (4.) b*Pv*CSP-All.

4.4 Determinação da resposta de anticorpos induzida em camundongos pela vacinação com y*Pv*CSAII_{FL} e y*Pv*AMA-1

4.4.1 Magnitude da resposta de anticorpos IgG (e isotipos de IgG) anti-yPvCSAII_{FL} e anti-yPvAMA-1

Para avaliar a magnitude da resposta de anticorpos induzida pela formulações vacinais testadas, camundongos das linhagens BALB/c (H-2^d) e C57BL/6 (H-2^b), foram submetidos a protocolo de imunização homólogo de indução e reforço, conforme descrito anteriormente. A cinética da resposta imune induzida pela vacinação com as proteínas recombinantes foi determinada por títulos de anticorpos, presentes nos soros recolhidos 14 dias após cada uma das 3 imunizações, e mensalmente, durante o período de acompanhamento para determinação da longevidade. Os títulos de anticorpos IgG foram determinados por ELISA, ensaios nos quais as placas foram sensibilizadas com as proteínas homólogas, y*Pv*CSAll_{FL} e y*Pv*AMA-1 (Figura 18).

A proteína yPvCSAll_{FL} induziu baixos títulos de IgG totais em camundongos BALB/c, que ainda foram reduzidos significativamente com a adição da proteína yPvAMA-1 (P<0,01) (Figura 18A). Reproduzindo experimentos prévios de nosso grupo (VICENTIN et al., 2014), a vacinação desta linhagem de animais com 3 doses do ectodomínio de AMA-1 induziu elevados títulos de anticorpos IgG específicos, os quais não sofreram influência com a coadministração de yPvCSAll_{FL} (P>0,05) (Figura 18A).

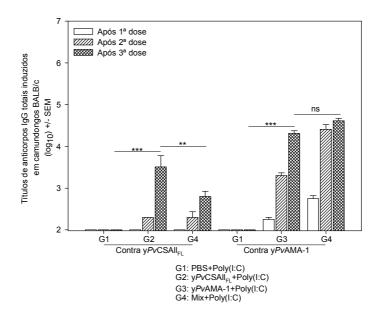
Devido à baixa imunogenicidade de yPvCSAll_{FL} verificada em camundongos BALB/c (H-2^d), a vacinação de uma segunda linhagem de animais com diferente complexo de histocompatibilidade foi iniciada. A linhagem de camundongos C57BL/6 (H-2^b) soroconverteu à yPvCSAll_{FL} após 1 dose da vacina e os títulos de anticorpos anti-yPvCSAll_{FL} tiveram efeito cumulativo após cada uma das doses da formulação administrada (Figura 18B), superando, após a dose final, os elevados títulos

observados com a proteína y*Pv*AMA-1 (P<0,01), e não sendo influenciados pela coadministração (P>0,05). As diferenças entre os camundongos H-2^d e H-2^b, diante da inoculação de y*Pv*CSAll_{FL}, foram de encontro às observações de YADAVA e colaboradores (2007) com a vacina VMP001. A resposta de anticorpos anti-y*Pv*AMA-1 não mostrou ser dependente do haplótipo de MHC dos animais avaliados, sendo os títulos induzidos em C57BL/6 (Figura 18B) equivalentes aos anteriormente observados em BALB/c.

Ao avaliar as subclasses de IgG, diferenças entre as linhagens de animais, novamente foram observadas. Entre IgG1, IgG2a, IgG2b, e IgG3, dosados nos soros de camundongos BALB/c, não foram identificadas diferenças significativas entre os títulos obtidos por ELISA, em nenhum dos grupos experimentais, apenas uma tendência de predomínio de IgG1 foi observada nos ensaios (Figura 19A). Os animais que receberam yPvCSAII_{FL} apresentaram razão IgG1/IgG2a de 3,67, a qual foi alterada para 10,67 com a coadministração a yPvAMA-1, valores que indicam balanceamento da resposta Th1/Th2. Os anticorpos induzidos contra yPvAMA-1 apresentaram valores próximos para a razão, sendo 11,33 o valor para o grupo que recebeu a proteína isolada e 6,67 no grupo que recebeu a coadministração.

Entre os animais C57BL/6, o grupo que recebeu a proteína yPvAMA-1 isolada manteve a resposta balanceada e não apresentou diferença significativa entre as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2c, e IgG3 (P>0,05). Entre os camundongos que receberam yPvCSAll_{FL}, a proteína isolada induziu um significativo (P<0,001) predomínio de anticorpos IgG1 (Figura 19B), padrão de resposta Th2 mantido entre os animais que receberam as proteínas combinadas. A razão IgG1/IgG2c dos anticorpos anti-yPvCSAll_{FL} foi de 64,00, a qual foi reduzida para 10,67 com a coadministração de AMA-1. Os animais que receberam yPvAMA-1 isoladamente apresentaram razão IgG1/IgG2c de 4,00 a qual subiu para 101,33 no grupo que recebeu a combinação. Os valores da razão IgG1/IgG2c mostram polarização para Th2 induzida por yPvCSAll_{FL}, a qual é balanceada por AMA-1 (Figura 19B).

A.



В.

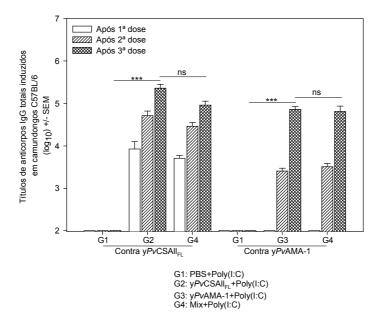
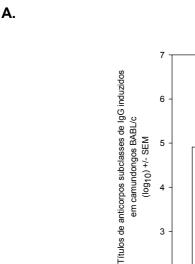
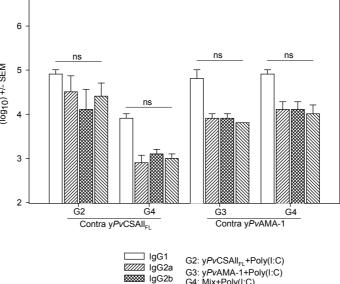


Figura 18 - **A imunogenicidade da proteína quimérica yPvCSAll**_{FL} **é linhagem-dependente.** Camundongos BALB/c (**A**.) e C57BL/6 (**B**.) foram imunizados 3 vezes, por via subcutânea (s.c.), com 10 μg de cada proteína recombinante produzida em levedura *P. pastoris* emulsificada no adjuvante Poly(I:C) (50 μg) com intervalo de 15 dias. Os animais do grupo controle receberam somente as proteínas recombinantes ou apenas o adjuvante, dissolvidos em PBS. Os resultados estão expressos como media aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo em log₁₀±SEM, e foram estatisticamente comparados usando *One-Way* ANOVA seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças estatisticamente significativas estão destacadas no gráfico: **P<0,01 e ***P<0,001. As Diferenças não significativas (n.s) estão indicadas (P>0,05).





Razão lgG1/lgG2a

G3 6,67

G4 11,33

Razão IgG1/IgG2a

G3 10.67

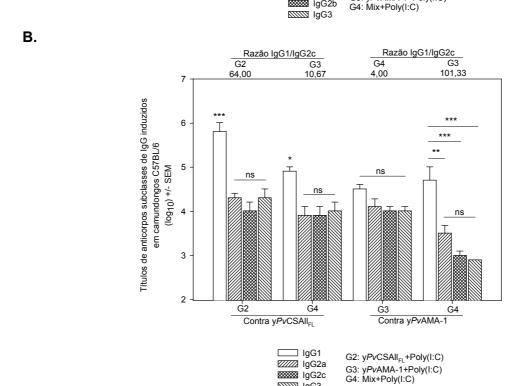


Figura 19 - A proteína quimérica yPvCSAll_{FL} induz resposta de anticorpos polarizada para Th2 em camundongos C57BL/6. Os isotipos, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3, induzidos em camundongos BALB/c (A.) e C57BL/6 (B.), foram avaliados por ELISA contra as proteínas homólogas yPvCSAll_{FL} e yPvAMA-1. Os títulos de anticorpos foram utilizados para cálculo da razão IgG1/IgG2a (A.) e IgG1/IgG2c (B.). Os resultados estão expressos como media aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo em log₁₀±SEM, e foram estatisticamente comparados usando One-Way ANOVA seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças estatisticamente significativas estão destacadas no gráfico: *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001. As diferenças não significativas (n.s) estão indicadas (P>0,05).

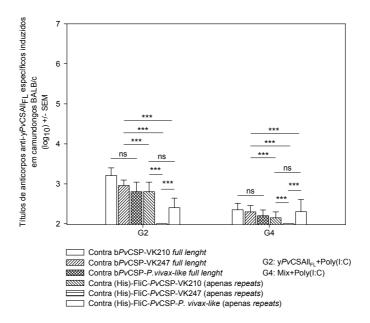
IgG2c IgG2c IgG3

4.4.2 Determinação da especificidade dos anticorpos anti-yPvCSAll_{FL}

Com o intuito de refinar a resposta de anticorpos anti-yPvCSAll_{FL} estes foram testados contra as proteínas recombinantes obtidas pelo sistema bacteriano de expressão bPvCSP-VK210, bPvCSP-VK247 e bPvCSP-P. vivax-like, que representam as variantes individuais de PvCSP (Figura 9). Ao comparamos os títulos de anticorpos IgG, obtidos em ensaios de ELISA, diferenças estatisticamente significativas (P<0,05) entre as 3 variantes alélicas não foram identificadas nos soros dos animais BALB/c (Figura 20A) ou C57BL/6 (Figura 20B) imunizados com a proteína yPvCSAll_{FL} isoladamente ou em combinação a yPvAMA-1, inferindo que não há prevalência de nenhuma variante na indução dos anticorpos anti-yPvCSAll_{FL}.

As bPvCSP possuem além dos *repeats* centrais, que as distinguem, as regiões N- e C-terminais de *Pv*CSP. Desta maneira, a fim de eliminar o viés dos anticorpos induzidos contra essas outras regiões da proteína, novos ensaios de avaliação da especificidade foram realizadas utilizando proteínas recombinantes contendo apenas os *repeats* centrais de cada uma das 3 variantes da proteína *Pv*CS em fusão com a flagelina FliC (Figura 10). Os resultados dos novos ensaios mostraram a significativa prevalência (P<0,001) dos *repeats* das variantes *Pv*CSP-VK210 e *Pv*CSP-*P. vivax-like* em relação ao da *Pv*CSP-VK247, tanto em animais BALB/c (Figura 20A) quanto em C57BL/6 (Figura 20B).

A.



В.

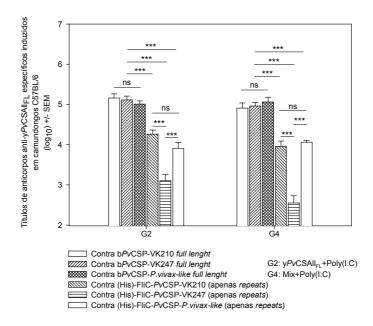


Figura 20 - Os anticorpos anti-yPvCSAll_{FL} reconhecem as diferentes variantes alélicas de PvCSP com predomínio dos repeats de VK210 e P. vivax-like. Os anticorpos anti-yPvCSAll_{FL} induzidos em camundongos BALB/c (A.) e C57BL/6 (B.), foram testados contra proteínas recombinantes expressas em sistema bacteriano representando as variantes alélicas individuais de PvCSP full lenght, bPvCSP-VK210, bPvCSP-VK247 e bPvCSP-P. vivax-like, bem como contra apenas os repeats centrais individuais fusionados a flagelina FliC. Os resultados estão expressos como media aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo em log₁₀±SEM, e foram estatisticamente comparados usando One-Way ANOVA seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças estatisticamente significativas estão destacadas no gráfico: ***P<0,001. As diferenças não significativas (n.s) estão indicadas (P>0,05).

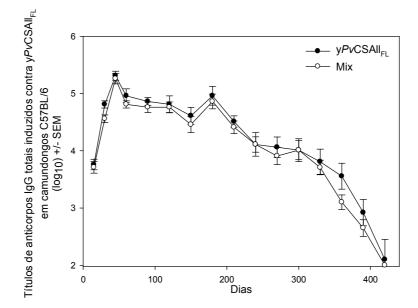
4.4.3 Determinação da longevidade dos anticorpos anti-yPvCSAll_{FL} e anti-yPvAMA-1

Devido à baixa indução da resposta de anticorpos contra a proteína yPvCSAll_{FL} a análise da longevidade dos anticorpos IgG foi realizada apenas em animais C57BL/6. Para o acompanhamento, coletas mensais de sangue foram realizadas, após a terceira dose vacinal. Ao total foram coletadas 16 amostras de sangue de cada camundongo, totalizando um acompanhamento de 476 dias de vida dos animais, 420 dias após a administração da última dose das formulações conforme demonstrado na Figura 11.

O grupo vacinado com yPvCSAll_{FL} e Poly(I:C) manteve os títulos de anticorpos IgG inalterados entre a terceira e nona coletas de sangue (P<0,05), momento em que foi identificado o primeiro decaimento significativo nos títulos induzidos. Após a identificação desta queda, os títulos permaneceram estáveis até a décima terceira coleta, momento que marcou o início do último declínio, e os anticorpos não responderam mais ao antígeno na décima sexta (Figura 21A). Entre os animais que receberam a coadministração, uma redução significativa dos títulos foi identificada na sétima coleta de sangue e novamente, na décima terceira, momento que também marcou o declínio final dos títulos de IgG contra a proteína yPvCSAll_{Fl}.

Com relação aos anticorpos IgG anti-yPvAMA-1, os animais que receberam a proteína isoladamente apresentaram declínio significativo em relação aos títulos alcançados com a terceira dose da vacina já 15 dias após esta (P<0,001) (Figura 21B). Após este momento os títulos permaneceram inalterados até a décima coleta, em que o segundo declínio significativo foi identificado (P<0,05). A terceira queda significativa nos títulos ocorreu na décima terceira coleta de sangue (P<0,01), ponto em que o declínio final de anticorpos anti-yPvAMA-1 foi iniciado. Os anticorpos IgG anti-yPvAMA-1 induzidos nos animais que receberam a coadministração de proteínas apresentaram declínio nos mesmos pontos temporais, porém ao compararmos as curvas é possível identificar uma tendência de desaceleração na redução dos títulos de IgG na presença de yPvCSAII_{FL}, ao longo do período de acompanhamento.

A.



В.

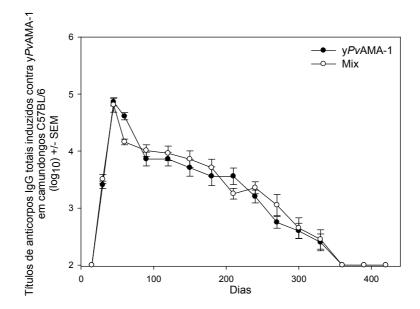


Figura 21 - Os anticorpos anti-yPvCSAll_{FL} induzidos permanecem elevados e inalterados mesmo depois de decorridos 165 dias da última dose da vacina. A longevidade dos anticorpos induzidos em camundongos C57BL/6 foi monitorada, por 389 dias após a terceira dose da vacina, por ELISA contra yPvCSAll_{FL} (A.) e yPvAMA-1 (B.). Os resultados estão expressos como a média aritmética dos títulos de cada grupo em $log_{10}\pm SEM$.

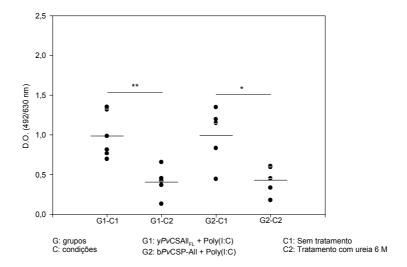
4.4.4 Avaliação comparativa da avidez dos anticorpos induzidos pelas construções quiméricas y*Pv*CSAII_{FL} e b*Pv*CSP-AII

Conforme mencionado no item 4.3 desta seção, a b*Pv*CSP-All foi produzida para ser utilizada como antígeno na avaliação comparativa da afinidade dos anticorpos IgG induzidos em camundongos C57BL/6, por ela e por y*Pv*CSAll_{FL}, em ensaios de ELISA. A ação desnaturante da ureia 6M sobre a afinidade anticorpo-proteína foi mais destacada sobre a construção eucariota (y*Pv*CSAll_{FL}) (P<0,01), nos ensaios contra a proteína homóloga (Figura 22A) e contra as 3 variantes alélicas de *Pv*CSP (Figura 22B). As ligações entre b*Pv*CSP-All e os anticorpos IgG anti-b*Pv*CSP-All foram menos sensíveis a ação desnaturante (P<0,5) em ambos os ensaios. As percentagens de avidez da proteína eucariota variaram de 29,57-36,30%, sendo a interação estabelecida entre os anticorpos anti-y*Pv*CSAll_{FL} e os epítopos da variante VK247 mais resistente a ação desnaturante da ureia 6M. As percentagens da proteína bacteriana variaram de 49,85-61,00%, com prevalência da interação de anticorpos anti-b*Pv*CSP-All com o epítopo de VK210 (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise comparativa das percentagens de avidez dos anticorpos antibPvCSP-All e anti-yPvCSAll_{FL} por suas proteínas recombinantes indutoras.

Anticorpo	Proteína	% de avidez
anti-b <i>Pv</i> CSP-All	b <i>Pv</i> CSP-VK210	61,00
	b <i>Pv</i> CSP-VK247	57,40
	b <i>Pv</i> CSP- <i>P. vivax-like</i>	49,85
anti-y <i>Pv</i> CSAll _{FL}	b <i>Pv</i> CSP-VK210	35,50
	b <i>Pv</i> CSP-VK247	36,30
	b <i>Pv</i> CSP- <i>P. vivax-like</i>	29,57

A.



В.

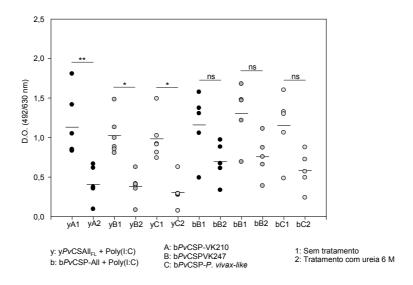


Figura 22 - Os anticorpos induzidos pela proteína recombinante quimérica obtida pelo sistema de expressão bacteriano possuem maior avidez por sua proteína indutora. Os anticorpos anti-b*Pv*CSP-All e anti-y*Pv*CSAll_{FL} induzidos em camundongos C57BL/6, por imunização na presença do adjuvante Poly(I:C), foram testados na diluição 1:12.800 contra suas proteínas homólogas indutoras (**A.**) e contra as variantes alélicas individuais de *Pv*CSP (**B.**), na presença e ausência de agente desnaturante (ureia 6M). A avidez dos anticorpos induzidos foi calculada pela razão entre as D.O._{492/630} na ausência de agente desnaturante e na presença de agente desnaturante multiplicada por 100%. Os resultados foram ainda estatisticamente comparados usando *One-Way ANOVA* seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças estatisticamente significativas estão destacadas no gráfico: *P<0,05, **P<0,01. As diferenças não significativas (n.s) estão indicadas (P>0,05).

4.5 Determinação da resposta celular induzida em camundongos C57BL/6 pela vacinação com y*Pv*CSAII_{FL} e y*Pv*AMA-1

4.5.1 Avaliação da proliferação de células TCD3⁺

A resposta imune contra malária requer além da indução de elevados títulos de anticorpos a participação celular no bloqueio e eliminação da infecção. Desta maneira, a fim de verificar a indução de respostas celulares populações de linfócitos T foram segregados em TCD3⁺TCD4⁺ e TCD3⁺TCD8⁺ pela estratégia de *gates* (Figura 23), e suas percentagens de proliferação obtidos pelo decaimento da fluorescência do fluorocromo FITC a que o corante CFSE está conjugado.

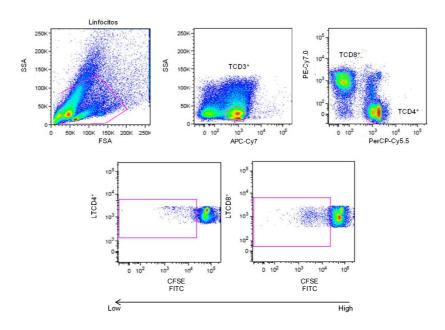
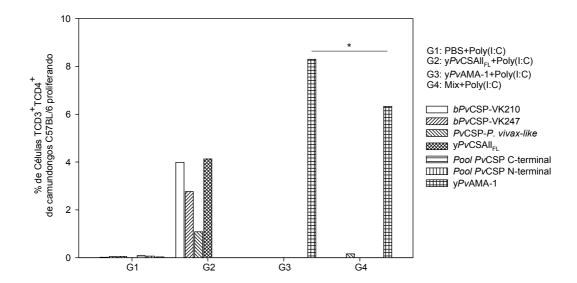


Figura 23 - Estratégia de *gates* utilizada para segmentar as populações celulares e permitir a análise da proliferação de células TCD3 $^+$ de camundongos C57BL/6 imunizados com as proteínas recombinantes yPv isoladamente ou em combinação. Os esplenócitos foram colocados em cultura 15 dias após a ultima dose da vacina e reestimulados, durante 5 dias, com 10 µg/mL das proteínas recombinantes, 26 µg/mL dos poo/s dos peptídeos sintéticos ou 2,5 µg /mL do mitógeno Con A. A figura é um *dot plot* representativo da estratégia.

A.



В.

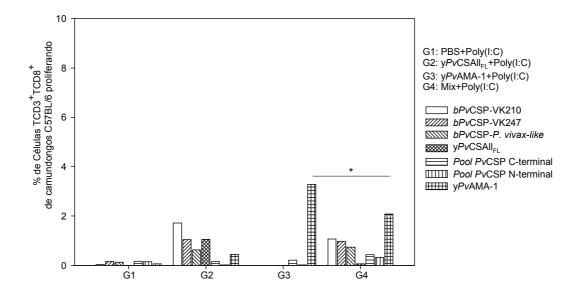


Figura 24 - A proteína recombinante yPvAMA-1 foi capaz de induzir, especificamente, a proliferação de células TCD3⁺TCD4⁺ e TCD3⁺TCD8⁺. Pool de esplenócitos foram coletados de camundongos C57BL/6 vacinados com as proteínas recombinantes yPv. As células foram marcadas com CFSE, plaqueadas e estimuladas, durante 5 dias, com as proteínas homólogas (10 μg), ou uma das variantes PvCSP (10 μg), ou pool de peptídeos sintéticos (26 μg), que cobrem toda a extensão das regiões C-terminal ou N-terminal de PvCSP, ou Con A (2,5 μg). Os eventos foram adquiridos em citômetro FACSCantolI™ e analisados utilizando o software FlowJo. Os resultados estão expressos como a porcentagem (%) de células TC3⁺TCD4⁺ (A.) ou TCD3⁺TCD8⁺ (B.) proliferativas. Os resultados foram estatisticamente comparados usando One-Way ANOVA seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças estatisticamente significativas estão destacadas no gráfico: *P<0,05.

A proliferação de células TCD3⁺TCD4⁺ foi comparativamente superior a de TCD3⁺TCD8⁺ em todos os grupos experimentais analisados (Figura 24). Nos grupos em que yPvCSAll_{FL} foi inoculada isoladamente, as células esplênicas TCD3⁺TCD4⁺ responderam positivamente ao estímulo das bPvCSP (1,08-4,00%) e os vacinados com yPvAMA-1 isoladamente à proteína recombinante homóloga (8,31%). A resposta proliferativa das células TCD3⁺TCD4⁺ do grupo que recebeu a coadministração foi significativamente reduzida em comparação aos grupos vacinados com as proteínas isoladas para todos os estímulos avaliados [0-0,20% com as bPvCSP e 6,33% na presença de yPvAMA-1] (Figura 24A).

A proliferação das células TCD3⁺TCD8⁺ dos animais que receberam y*Pv*CSAll_{FL} isoladamente apresentaram proliferação de 0,62-1,72%, na presença das b*Pv*CSP, enquanto que na coadministração as porcentagens foram de 0,74-1,07% na coadministração com y*Pv*AMA-1. Nas células TCD3⁺TCD8⁺ dos animais imunizados com y*Pv*AMA-1 isoladamente a porcentagem de proliferação foi de 3,28%, a qual foi reduzida para 2,08% com a combinação a y*Pv*CSAll_{FL}. Neste segundo tipo celular a influência da combinação de antígenos sobre a resposta celular induzida teve menor magnitude (Figura 24B).

4.5.2 Avaliação da secreção de citocinas

4.5.2.1 Dosagem de IFN-γ por ELISPOT

Apenas células ativadas podem efetivamente contribuir para a indução de proteção contra a malária. Assim, para verificar se as células proliferativas identificadas nos ensaios utilizando CFSE eram efetoras, a secreção de citocinas na cultura dos linfócitos foi avaliada. A secreção por esplenócitos da citocina IFN-γ foi determinada por ensaios de ELISPOT e posteriormente por CBA. Nesta primeira técnica uma resposta específica foi associada apenas ao estímulo y*Pv*AMA-1 e o padrão de

resposta reduzido pela coadministração dos antígenos foi mantido. Nos campos correspondentes a animais vacinados com yPvAMA-1 isoladamente foram contados uma média de 1403 *spots*, número que foi reduzido significativamente (P<0,001) para 344 *spots* nos campos correspondentes ao grupo da combinação (Figura 25).

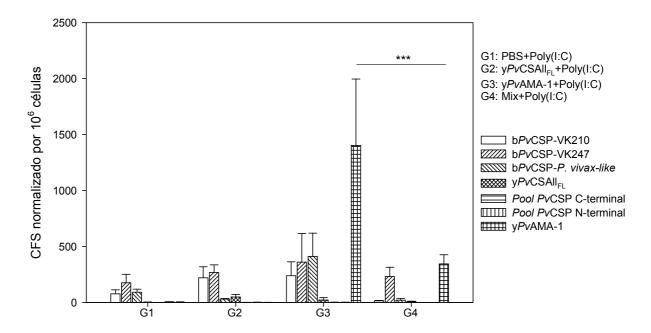


Figura 25 - A proteína recombinante yPvAMA-1 foi capaz de induzir, especificamente, a secreção de IFN-γ. Esplenócitos foram coletados, individualmente, de camundongos C57BL/6 imunizados. As células foram plaqueadas e estimuladas, durante 24 horas, com as proteínas recombinantes homólogas (10 μg), ou uma das variantes alélicas de PvCSP (10 μg), ou pools de peptídeos sintéticos (26 μg), que cobrem a totalidade das regiões C-terminal ou N-terminal de PvCSP, ou Con A (2,5 μg). A secreção de IFN-γ foi avaliada por ELISPOT ex-vivo. As barras representam a resposta em número de células formadoras de spots. Os resultados foram ainda estatisticamente comparados usando One-Way ANOVA seguido por Tukey test para múltiplos eventos. As diferenças estatisticamente significativas estão destacadas no gráfico: ***P<0,001.

4.5.2.2 Dosagem de IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A e IL-10 por *Cytometric* Bead Array (CBA)

Para identificar a secreção de outras citocinas por células TCD3+, e verificar a reprodutibilidade do resultado de ELISPOT para IFN-γ, o kit CBA Th1/Th2/Th17, com *beads* específicas para as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A e IL-10, foi utilizado, Figura 26.

Os resultados da técnica que se baseia em citometria de fluxo demonstraram o mesmo padrão de resposta para IFN- γ , verificado nos ensaios de ELISPOT (Figura 25), com secreção específica apenas associada ao estímulo yPvAMA-1 (Figura 26), e mostram um predomínio das citocinas IL-2, TNF- α e IL-10, associadas ao estímulo yPvAMA-1, níveis que foram alterados com a combinação a y $PvCSAII_{FL}$. Na coadministração de antígenos o índice de secreção de IL-2 foi elevado de 34,7% para 55,4%, em detrimento dos índices de IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-10, de 8,8%, 5,1%, 13,2% e 38% para 1,8%, 2,5%, 11,8% e 28,4%, respectivamente.

O decréscimo na secreção de interleucinas pode ser associado a redução das células TCD3⁺TCD4⁺ e TCD3⁺TCD8⁺, conforme resultado dos ensaios de proliferação. Os grupos estimulados com yPvCSAll_{FL} também apresentaram elevação de IL-2, de 8,7% para 15,9%, com a combinação, entretanto, as células desses animais apenas secretaram índices detectáveis de IL-6 e TNF-α, de 16,5% e 75,1% para 27,9% e 55%, respectivamente, e os elevados níveis de TNF-α podem ser correlacionados a ausência de IL-10, sua citocina reguladora.

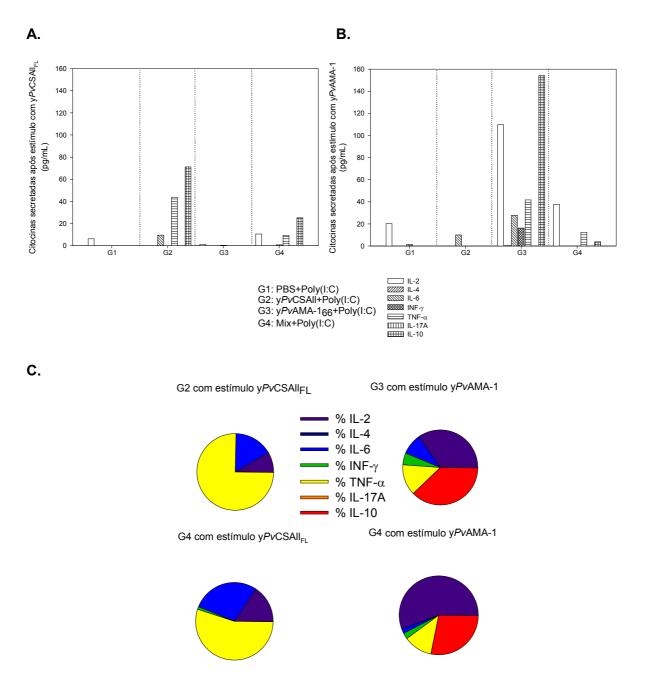


Figura 26 - A secreção de IFN-γ, IL-4, TNF-α e IL-10 foram associadas ao estímulo com yPvAMA-1 em citometria de fluxo utilizando o kit Th1/Th2/Th17 de CBA. Esplenócitos foram coletados de camundongos C57BL/6 imunizados. As células foram plaqueadas e estimuladas, durante 5 dias, com as proteínas recombinantes homólogas (10 μg), ou uma das variantes alélicas de PvCSP (10 μg), ou pools de peptídeos sintéticos (26 μg), que cobrem a totalidade das regiões C-terminal ou N-terminal de PvCSP, ou Con A (2,5 μg). O sobrenadante da cultura foi utilizado para a determinação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A e IL-10, utilizando beads específicas. Os eventos foram adquiridos em citômetro FACSCantoII™ e analisados utilizando o software FCAP Array™. Os resultados estão expressos em pg/mL após estímulo com yPvCSAII_{FL} (A.), yPvAMA-1 (B.) e em porcentagem (C.). As linhas pontilhadas separam os grupos para facilitar a visualização.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A malária é um grave problema de saúde pública mundial, e apesar das contínuas intervenções dos órgãos de saúde, o controle mundial das infecções não foi atingido, levando a óbito milhares de pessoas, especialmente crianças com idade inferior a 5 anos (WHO, 2013). Esse contexto é propício para os investimentos em formulações vacinais, principalmente as multiantigênicas capazes de não só bloquear a infecção como reduzir a parasitemia, diminuindo a morbidade e mortalidade associadas à doença (DOOLAN; HOFFMAN, 2001; HILL, 2011; NOSSAL, 2011; RICHARDS; BEESON, 2009; RILEY; STEWART, 2013; TAKALA; PLOWE, 2009).

Os investimentos para pesquisa cresceram consideravelmente nos últimos anos, porém, a parte massiva dos recursos e pesquisas continua direcionada predominantemente ao *P. falciparum*. O intenso esforço na obtenção de uma formulação vacinal específica para *P. falciparum*, baseada na elevada e consistente imunogenicidade observada, tanto com a inoculação do parasito atenuado como em antígenos particulares da espécie, foi refletida na vacina RTS,S, cujos dados dos ensaios clínicos de fase III [NCT00866619] estão em fase de finalização (AGNANDJI et al., 2012; GARÇON; HEPPNER; COHEN, 2003; GUINOVART et al., 2009; WHITE, 2011; WHITE et al., 2013b).

Quanto às vacinas de fase eritrocítica os antígenos MSP e AMA-1 são os mais explorados. Em testes clínicos, são encontradas baseadas em AMA-1 as vacinas proteicas FMP2.1/AS01B, fase I/IIa [NCT00385047] que utiliza o ectodomínio de AMA-1 expresso em bactérias *E. coli*, na presença do adjuvante AS01B (SPRING et al., 2009), em Ia/Ib *Pf*AMA1-DiCo com uma proteína recombinante expressa em *P. pastoris* e os adjuvantes Alum e GLA-SE (REMARQUE et al., 2008b), e as vacinas utilizando vetores virais ChAd63/MVA (CS; ME-TRAP), em fase I/IIa [NCT01623557] (REYES-SANDOVAL et al., 2010), ChAd63-AMA-1/MVA-AMA-1, em fase IIa [NCT01142765] (BISWAS et al., 2011), NMRC-M3V-Ad-*Pf*CA, em fase I/IIa [NCT00392015] (SEDEGAH et al., 2011; TAMMINGA et al., 2011) e ChAd63-AMA-1-MVA-AMA-1+alhydrogel/CPG7909 em fase I [NCT01351948] (DE CASSAN et al., 2011).

Entre estas vacinas em testes clínicos, 2 coadministram *Pf*CSP e *Pf*AMA-1. A formulação ChAd63/MVA (CS; ME-TRAP) foi idealizada com o intuito de induzir resposta celular contra os antígenos CSP e AMA-1. Esta vacina induziu forte e duradoura resposta de células TCD3⁺TCD8⁺ secretoras de IFN-γ, em camundongos BALB/c (BISWAS et al., 2011), o que também foi visualizado com NMRC-M3V-Ad-*Pf*CA que gerou células multifuncionais TCD3⁺TCD4⁺ e TCD3⁺TCD8⁺ secretoras de IFN-γ, TNF-α e IL-2, em voluntários humanos *naive* (SEDEGAH et al., 2011; TAMMINGA et al., 2011).

Os poucos grupos que se especializaram no estudo do *P. vivax* combinam seus esforços para que esta espécie do parasito não seja mais denominada como benigna, despertando novos investimentos (ALEXANDRE et al., 2010; COSTA et al., 2012; GALINSKI; BARNWELL, 2008; LACERDA et al., 2012; PARAKH et al., 2009; SARKAR et al., 2008). Proteínas recombinantes de *P. vivax*, baseadas em CSP, MSP-1, MSP-3 e AMA-1, tiveram sua imunogenicidade avaliada por nosso grupo em camundongos, e foram capazes de induzir altos títulos de anticorpos, quando administrados individualmente (BARGIERI et al., 2008; BITENCOURT et al., 2013; CUNHA; RODRIGUES; SOARES, 2001; GENTIL et al., 2010; MÚFALO et al., 2008; ROSA et al., 2004; SOARES; RODRIGUES, 2002; TEIXEIRA et al., 2014; VICENTIN et al., 2014) e em combinações (CASALE, 2013; PEREIRA, 2012; TEIXEIRA et al., 2014) que abordaram antígenos de um único estágio do ciclo de vida do parasito.

PEREIRA (2012) avaliou a combinação de b*Pv*MSP-1₁₉-PADRE, b*Pv*MSP-3β e y*Pv*AMA-1 em animais BALB/c e C57BL/6, na presença de Poly(I:C) e Quil A. Emulsificada em Poly(I:C), a coadministração induziu em BALB/c anticorpos preferencialmente contra o ectodomínio de AMA-1, e em C57BL/6 contra MSP-3β. A longevidade dos anticorpos variou entre as linhagens de animais e entre as proteínas recombinantes indutoras. Em ambas as linhagens, os anticorpos induzidos contra y*Pv*AMA-1 apresentaram a menor longevidade, com queda significativa após 15 dias da terceira dose da vacina (dados não publicados). A resposta celular da coadministração desses 3 antígenos foi avaliada por CASALE (2013). Neste trabalho a proliferação de células TCD3⁺TCD4⁺ e TCD3⁺TCD8⁺ foi associada apenas a estimulação com a proteína y*Pv*AMA-1. Com a técnica de ELISPOT a ativação dessas células foi verificada com a secreção de IFN-γ (dados não publicados).

TEIXEIRA e colaboradores (2014) avaliou a imunogenicidade de 4 construções de *Pv*CSP em camundongos C57BL/6 na presença dos adjuvantes ACF/AIF e Poly(I:C). A coadministração das 3 variantes individuais e a proteína b*Pv*CSP-All emulsificadas em ACF/AIF induziram títulos de anticorpos IgG equivalentes, porém na presença de Poly(I:C), os anticorpos anti-b*Pv*CSP-All foram significativamente inferiores aos gerados pela combinação. Após 3 doses de 10 μg, a proteína b*Pv*CSP-All com Poly(I:C) induziu títulos de 10⁵, os quais reconheceram as regiões de repetição e de não repetição de *Pv*CSP. Neste trabalho não foi avaliado o reconhecimento de anticorpos contra a quimérica b*Pv*CSP-All pela proteína nativa *Pv*CSP, bem como também não foi avaliada a resposta celular induzida por esta construção proteica. Os autores avaliaram estes aspectos apenas da vacina que administrou as 3 variantes alélicas individuais concomitantemente. Os anticorpos contra a coadministração foram capazes de reconhecer a proteína da superfície dos esporozoítos em ensaios de imunofluorescência, mas a vacina foi incapaz de induzir resposta imune mediada por células.

O presente estudo avaliou a eficiência de uma formulação composta por regiões imunodominantes de antígenos de 2 estágios distintos do ciclo de vida do *P. vivax* obtidos pelo sistema de expressão eucariótico em levedura *P. pastoris*, cujas vantagens são a natureza eucariótica do processo, o alto rendimento na obtenção de proteínas heterólogas, e a solubilidade das proteínas recombinantes, não proporcionada pelo sistema bacteriano de expressão. A proteína recombinante da fase pré-eritrocítica originada foi denominada y*Pv*CSAll_{FL}, e corresponde a uma nova construção quimérica que compreende epítopos mapeados nos *repeats* da região central das 3 cepas variantes, VK210, VK247 e *P. vivax-like*, flanqueados pelas regiões N- e C-terminais da proteína *Pv*CS.

Isolados de *P. vivax*, apresentam variações alélicas na região central de CSP, que não apresentam reação cruzada de anticorpos policionais (QARI et al., 1991), e são conservadas por pressão evolutiva para escape imune (GALINSKI et al., 1987). As 3 variantes possuem distribuição mundial (IMWONG et al., 2005; KAIN et al., 1992; MACHADO; PÓVOA, 2000; OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004; STORTI-MELO et al., 2009; ZAKERI et al., 2006), e circulam no Brasil (MACHADO; PÓVOA, 2000; STORTI-MELO et al., 2009) em áreas endêmicas da Amazônia Legal como Pará

(MACHADO et al., 2003), Rondônia e Mato Grosso (ARRUDA et al., 2007) e não endêmicas de São Paulo (CURADO et al., 1997).

O antígeno AMA-1, expresso nos estágios pré-eritrocítico e eritrocítico assexuado, foi selecionado devido aos resultados promissores obtidos em trabalhos anteriores do grupo, nos quais a proteína yPvAMA-1 mostrou elevada imunogenicidade em camundongos BALB/c (VICENTIN et al., 2014) e C57BL/6 (PEREIRA, 2012; CASALE, 2013). Entre as formulações analisadas, anticorpos gerados por formulações de yPvAMA-1, na presença de MPLA e Quil A, reconheceram a proteína nativa em ensaios de imunofluorescência com lâminas de merozoítos e esquizontes jovens de P. vivax, obtidos de amostras de sangue de pacientes residentes da Tailândia (VICENTIN et al., 2014).

Com o intuito de empregar AMA-1 em imunizações de primatas não humanos, o protocolo de obtenção desta proteína recombinante foi validado pela empresa Farmacore Biotecnologia (BRA Co., Ribeirão Preto, SP) que gerou yPvAMA-1 sob Boas Práticas de Laboratório (condições BPL) (VICENTIN et al., 2014). Os ensaios de caracterização de yPvAMA-1 BPL seguiram as Normas Regulatórias ABNT ISSO 9001:2000, ABNT 17025:2005 e critérios para o credenciamento de laboratórios de ensaios do INMETRO, e nestes a proteína foi caracterizada com pureza superior a 85%, livre de contaminantes e com concentração de endotoxina de 7,21 EU/mg. Ao ser inoculada em animais BALB/c, na presença dos adjuvantes MPLA, Alum combinado a MPLA, Quil A e AIF, yPvAMA-1 BPL induziu títulos de anticorpos similares aos obtidos com a proteína produzida pelo grupo, e os anticorpos gerados na presença de Quil A foram capazes de impedir a re-invasão de reticulócitos, em 10,79-43,38%, por 4 diferentes isolados tailandeses de *P. vivax* (VICENTIN et al., 2014).

AMA-1 apresenta intenso polimorfismo, o qual é associado a estratégias de escape imune, e pode representar entraves para vacinas baseadas neste antígeno. Resultados recentes de ensaios clínicos de fase II utilizando a vacina FMP2.1/AS02, baseada em *Pf*AMA-1, argumentam fortemente a favor da resposta à infecção ser cepa-específica (THERA et al., 2011), o que requisita a inserção de múltiplos epítopos mapeados em regiões polimórficas de diferentes cepas de *Pf*AMA-1 em uma formulação para a obtenção de uma vacina baseada neste antígeno adequada (DREW et al., 2012; TAKALA et al., 2009).

A influência do polimorfismo entre as variantes alélicas de *Pv*AMA-1 sobre a indução de resposta imune não foi estudado até o momento, podendo ou não ser reflexo do que ocorre em *P. falciparum*. Assim como ocorre com outros antígenos, estratégias estão sendo exploradas pelos grupos de *Pf*AMA-1 para limitar a inserção de variantes a serem coadministradas (DREW et al., 2012; FABER et al., 2013; MIURA et al., 2013), abordagem que pode vir a ser extrapolada para as outras espécies do parasito caso a influência do polimorfismo seja semelhante.

As proteínas recombinantes yPvCSAll_{FL} e yPvAMA-1, através de ensaios biofísicos e bioquímicos, tiveram sua estrutura secundária predita. Os resultados de *immunoblotting* confirmaram a expressão de ambas em sua forma íntegra, e os resultados de dicroísmo circular mostram predomínio de estruturas secundárias em fitas beta, achados consistentes com a estrutura cristalográfica de PvAMA-1 determinada por PIZARRO e colaboradores (2005) e a de 2 PfCSP analisadas biofisicamente (PLASSMEYER et al., 2009), sendo que yPvCSAll_{FL} ainda apresentou elevada estabilidade a períodos prolongados de aquecimento.

A antigenicidade do ectodomínio de AMA-1, descrita por VICENTIN e colaboradores (2014), foi confirmada pelo seu reconhecimento por anticorpos IgG de 78,77% dos 174 soros de indivíduos infectados por *P. vivax* provenientes das regiões endêmicas de Goianésia (PA), Porto Velho (RO), Rio Branco (AC) e Macapá (AM), Amazônia Legal brasileira. A construção quimérica y*Pv*CSAll_{FL} foi reconhecida por menos de 10% dos soros testados (dados não apresentados), um reconhecimento que vai de encontro aos resultados de outros trabalhos de sorologia (ARRUDA et al., 2007).

Uma resposta eficiente contra o *Plasmodium* requisita à indução das respostas imunes inata e adaptativa através da indução de anticorpos e células efetoras secretoras de citocinas (ARÉVALO-HERRERA; CHITNIS; HERRERA, 2010; NARDIN; NUSSENZWEIG, 1993; POTOCNJAK et al., 1980; RÉNIA et al., 1993; RODRIGUES; DUTRA; YOSHIDA, 1991; ROMERO et al., 1989; TSUJI, 2010; VANDERBERG; STEWART, 1990). Os antígenos pré-eritrocíticos, apesar do curto período de tempo que permanecem na circulação sanguínea são indutores de resposta de anticorpos que visam bloquear sua motilidade, associada à CSP, mas o predomínio da resposta deflagrada é celular, através células TCD3⁺TCD8⁺ citotóxicas secretoras de IFN-γ (ARTAVANIS-TSAKONAS; RILEY, 2002; HOFFMAN; DOOLAN, 2000; HOLLINGDALE et al., 1984; NOSSAL, 2011; RILEY et al., 2006).

As células TCD3⁺TCD4⁺ atuam complementariamente, auxiliando na ativação e diferenciação de células B ou de CTL (DOOLAN; MARTINEZ-ALIER, 2006).

Durante o estágio eritrocítico assexuado, a ação dos anticorpos é determinante para a redução da parasitemia e sintomatologia associada (DUTTA et al., 2005; HEALER et al., 2002; HODDER; CREWTHER; ANDERS, 2001; KOCKEN et al., 2002; LALITHA et al., 2004; MITCHELL et al., 2004; SRINIVASAN et al., 2011). Colaborando para o controle da parasitemia, células TCD3⁺TCD4⁺ restringem o crescimento do parasito com a secreção de citocinas, estimulação de células B e ativação de macrófagos (SPENCE; LANGHORNE, 2012).

A magnitude da resposta induzida pela formulação yPvAMA-1, na presença do adjuvante agonista de TLR3 Poly(I:C), em camundongos BALB/c, foi equiparável as obtidas com os adjuvantes Alum combinado a MPLA e MPLA, dado bastante considerável, visto que os títulos induzidos por estas 2 formulações só foram inferiores aos do ectodomínio de AMA-1 na presença de Quil A e de AIF (VICENTIN et al., 2014), 2 adjuvantes não permitidos para inoculação em humanos devido a intensidade de seus efeitos adversos (GUPTA et al., 1993). Esta elevada imunogenicidade foi preservada na linhagem C57BL/6, como demonstrado anteriormente (CASALE, 2013; PEREIRA, 2012).

A indução de resposta por anticorpos associada à inoculação de yPvCSAll_{FL} mostrou resultados linhagem-dependente, sendo os títulos de anticorpos IgG visualizados em C57BL/6 significativamente superiores aos de BALB/c (10⁶ e 10⁴, respectivamente). A diferença na indução de anticorpos pela proteína quimérica yPvCSAll_{FL} entre as 2 linhagens de camundongos foi condizente com o observado por YADAVA e colaboradores (2007) com a vacina VMP001, que também explora uma construção quimérica de PvCSP, e a magnitude dos títulos gerados em C57BL/6 pela construção quimérica eucariota superam os gerados pela proteína bPvCSP-All em magnitude e longevidade (TEIXEIRA et al., 2014).

A fim de determinar o direcionamento da resposta humoral induzida pela construção quimérica eucariota, utilizamos proteínas recombinantes, expressas pelo sistema bacteriano, que representam a estrutura completa das variantes genéticas naturais de *Pv*CSP (TEIXEIRA et al., 2014). Com essa abordagem, verificamos o reconhecimento de todas as 3 variantes (VK210, VK247 e *P. vivax-like*) de forma semelhante, fato que nos levou a questionar o predomínio do reconhecimento dos

repeats em relação às regiões N- e C-terminais das proteínas (ANCSIN; KISILEVSKY, 2004; RATHORE et al., 2005; TEWARI et al., 2002).

Para eliminar esse viés, reavaliamos a especificidade dos anticorpos anti-yPvCSAll_{FL} utilizando construções em que apenas os *repeats* das variantes de CSP estavam em fusão com a flagelina (FliC) de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium (CAMACHO et al., 2011; LEAL et al., 2013), e os resultados demonstraram um elevado reconhecimento dos *repeats* com predomínio significativo do reconhecimento das sequências centrais de bPvCSP-VK210 e bPvCSP-P. *vivax-like* em comparação ao de bPvCSP-VK247. O direcionamento dos anticorpos anti-PvCSAll_{FL} para os *repeats* vai de encontro a observações anteriores com *P. berghei* (YOSHIDA et al., 1980), confirmadas para *P. vivax* com a utilização de esporozoítos transgênicos de *P. berghei* expressando o domínio repetição de VK210 (ESPINOSA et al., 2013).

A isotipagem dos anticorpos IgG nos soros de camundongos BALB/c não identificou diferenças significativas entre os títulos de IgG1, IgG2a, IgG2b, e IgG3, para nenhuma das proteínas recombinantes, apesar de ser possível identificar uma tendência de predomínio de IgG1, caracterizando um balanço Th1/Th2 na resposta induzida em camundongos H-2^d. Nos soros dos animais C57BL/6 imunizados com yPvCSAll_{FL}, isoladamente, um significativo predomínio dos títulos de IgG1 sobre os de IgG2a, IgG2c, e IgG3, foi identificado, proporcionando uma polarização para resposta para Th2, associada a proteção contra a infecção (BOUHAROUN-TAYOUN; DRUILHE, 1992a, 1992b). Esta tendência também foi identificada entre os animais que receberam a combinação de proteínas, porém numa intensidade muito mais reduzida, inferindo que a presença de yPvAMA-1 leva ao balanceamento da resposta humoral induzida.

Os resultados dos estudos clínicos realizados com a vacina RTS,S/AS01 demonstraram forte correlação entre o desenvolvimento de uma imunidade protetora e a presença de anticorpos contra a *Pf*CSP (KESTER et al., 2009; OLOTU et al., 2013). Neste contexto, a longevidade dos anticorpos induzidos é bastante crítica para a manutenção da resposta protetora. Os resultados do acompanhamento de camundongos C57BL/6 imunizados com a proteína quimérica y*Pv*CSAll_{FL} são bastante interessantes. Os anticorpos anti-y*Pv*CSAll_{FL}, permaneceram inalterados ao longo de 165 dias, após a administração da terceira dose da vacina, quando

apresentaram uma queda estatisticamente significativa, antes de permanecerem inalterados por mais 90 dias. Os anticorpos induzidos contra a quimérica, na coadministração, também apresentaram pouco decréscimo de seus títulos de anticorpos IgG ao longo do período.

Com relação aos anticorpos induzidos contra yPvAMA-1, estes apresentaram uma longevidade, comparativamente menor a da proteína quimérica, resultado que vai de encontro ao observado por PEREIRA (2012) com camundongos BALB/c e C57BL/6. Após 15 dias da administração da terceira dose da vacina, foi visualizado um prejuízo significativo nos títulos de anticorpos IgG. O decaimento estabilizou por 180 dias antes de uma segunda queda ser identificada. Os anticorpos anti-yPvAMA-1 induzidos na coadministração também apresentaram redução estatisticamente significativa, entre os mesmos períodos, porém ao compararmos sua curva de títulos de anticorpos com a do grupo que recebeu a proteína isoladamente identificamos uma tendência de desaceleração da queda, ao longo do período de acompanhamento.

A secreção de citocinas por células efetoras TCD3⁺TCD8⁺ e TCD3⁺TCD4⁺ é capaz de ativar macrófagos que fagocitem hepatócitos e eritrócitos infectados, além de merozoítos livres, impedindo a elevação da parasitemia (STEVENSON; RILEY, 2004). Diferentes estudos, realizados em modelos animais e no homem, demonstram consenso no fato de que a habilidade do hospedeiro em regular a magnitude e o tempo da resposta inflamatória à infecção parasitária é determinada pela secreção de citocinas e quimicionas inflamatórias reguladoras como o IFN-γ, IL-2 e IL-10, em níveis apropriados (FINNEY; RILEY; WALTHER, 2010). Assim, a resposta induzida de yPvCSAll_{FL} e yPvAMA-1 mediada por células foi avaliada pelos ensaios de decaimento de CFSE, ELISPOT e CBA.

A proliferação de células TCD3⁺TCD4⁺ e TCD3⁺TCD8⁺ específica à estimulação *in vitro* com y*Pv*CSAll_{FL} foi bastante reduzida, assim como o índice de secreção de IFN-γ na detecção *ex vivo* por ELISPOT e de IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α e IL-10, *in vitro* por CBA. A dosagem de IFN-γ por CBA reproduziu os resultados de ELISPOT para IFN-γ, e identificou apenas a secreção das citocinas IL-2, IL-6 e TNF-α. Uma baixa resposta celular induzida por y*Pv*CSAll_{FL} também foi observada com a principal candidata a vacina contra malária *falciparum*.

A RTS, S mostrou ser incapaz de induzir TCD3⁺TCD8⁺ e as células TCD3⁺TCD4⁺ detectadas não tiveram sua ativação confirmada (WHITE et al., 2013a). Respostas celulares induzidas por CSP só puderam ser verificadas com a administração de vetores virais em estratégias homólogas e heterólogas, como mostram os resultados de ChAd63/MVA [CS; ME-TRAP] (REYES-SANDOVAL et al., 2010) e NMRC-M3V-Ad-*Pf*CA (SEDEGAH et al., 2011; TAMMINGA et al., 2011).

As citocinas identificadas após estimulação com a quimérica y*Pv*CSAll_{FL} caracterizam um padrão Th1 de resposta similar ao obtido com uma proteína *Pf*CS expressa em *E. coli* que quando administrada com Poly(I:C) induziu células TCD3⁺TCD4⁺ produtoras de IL-2, TNF-α e IFN-γ (TEWARI et al., 2010).

Em resposta a yPvAMA-1 houve destacada e específica proliferação de células TCD3⁺TCD4⁺ e TCD3⁺TCD8⁺, com predomínio da primeira linhagem, e secreção de IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α, identificadas por CBA, e IFN-γ identificada por ELISPOT e CBA. Os resultados de proliferação reproduzem as observações de CASALE (2013) e são compatíveis com os dados obtidos pelo estímulo *in vitro* com a proteína recombinante PvAMA-1 de camundongos BALB/c, explorando protocolos homólogos e heterólogos na presença do adjuvante Montanide ISA 720 (BOUILLET et al., 2011).

Os resultados demonstram que a utilização de múltiplos antígenos fusionados, e/ou coadministrados, pode ser bastante interessante, mas é cercada de maiores desafios, proporcionais ao número de moléculas escolhidas e a complexidade estrutural das mesmas. A imunogenicidade de yPvCSAll_{FL} não influenciável pela combinação a um potente antígeno, quanto a resposta de anticorpos na linhagem que respondeu a vacinação de PvCSP, torna esta construção bastante interessante para testes de formulações vacinais multiantígenos.

Entre as limitações deste estudo, não puderam ser obtidos resultados de testes funcionais como o reconhecimento da proteína nativa pelos anticorpos induzidos e ensaios de inibição da re-invasão de células sanguíneas, dificuldades inerentes a *P. vivax* e que não puderam ser contornadas devido a baixa qualidade das lâminas de formas pré-eritrocíticas e eritrocíticas assexuadas com as quais tivemos contato. Estes ensaios bem como a avaliação da imunogenicidade em primatas não humanos, podem ser abordados em estudos subsequentes com a proteína

 $yPvCSAII_{FL}$, uma promissora candidata, na busca de uma vacina global contra malária *vivax*.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- i. As proteínas recombinantes yPvCSAll_{FL} e yPvAMA-1, foram obtidas a partir de leveduras P. pastoris com elevado rendimento e pureza, sem produtos de degradação. Os epítopos das 3 variantes de PvCSP foram preservados na molécula desenovelada que detém predomínio de fitas β em sua estrutura secundária.
- ii. As proteínas yPv são imunogênicas, na presença do adjuvante Poly(I:C). A proteína yPvCSAll_{FL} mostrou elevada imunogenicidade em animais C57BL/6, nos quais os títulos de anticorpos induzidos foram superiores aos anticorpos anti-yPvAMA-1 e não foram influenciados pela inoculação combinada.
- iii. A análise da especificidade dos anticorpos anti-yPvCSAll_{FL} mostrou direcionamento da indução de anticorpos IgG para os repeats centrais de PvCSP, com prevalência de resposta para os epítopos das variantes alélicas VK210 e P. vivax-like.
- iv. Ao compararmos a porcentagem de avidez dos anticorpos induzidos contra a construção quimérica obtida em *P. pastoris* com a dos gerados contra a obtida em bactérias *E. coli* verificamos que a interação da proteína bacteriana e seu anticorpo é mais resistente a ação desnaturante, e a avidez, dos anticorpos pelos epítopos de VK210 é maior que a estabelecida com os epítopos das outras 2 variantes.
- v. Os anticorpos anti-yPvCSAll_{FL} demonstraram considerável longevidade em animais C57BL/6, cujos títulos induzidos permaneceram inalterados por mais de 120 dias após a administração do último reforço das vacinas. A combinação de yPvAMA-1 não influenciou a longevidade dos anticorpos induzidos contra a proteína quimérica, mas yPvCSAll_{FL} parece desacelerar a queda nos títulos de anticorpos anti-yPvAMA-1, os quais foram significativamente reduzidos já 15 dias após o último reforço da vacina.
- vi. A proteína quimérica não foi capaz de induzir resposta celular específica. Nos grupos vacinados com yPvAMA-1 foi possível verificar níveis reduzidos de proliferação de células TCD3⁺TCD4⁺ e TCD3⁺TCD8⁺ efetoras, com secreção

- das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-6, TNF- α e IL-10. A combinação de y*Pv*CSAll_{FL} reduziu as percentagens de proliferação de células TCD3⁺.
- vii. Em conjunto, nossos dados demonstram que a utilização de múltiplos antígenos fusionados, e/ou coadministrados, pode ser uma estratégia vacinal bastante interessante, porém a análise e interpretação da resposta imune induzida pela inoculação é dificultada pelo número de antígenos presentes na formulação, bem como pela complexidade individual de suas moléculas. A proteína quimérica yPvCSAll_{FL} mostrou ser imunogênica em camundongos, sendo uma candidata promissora a testes em primatas não humanos, e os resultados de sua administração combinada a de um antígeno de outra fase do ciclo de vida do parasito mostraram que esta estratégia é bastante viável na obtenção de uma vacina global contra malária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNANDJI, S. T. et al. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. **The New England journal of medicine**, v. 367, n. 24, p. 2284–95, 13 dez. 2012.

AKIRA, S. Innate immunity and adjuvants. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 366, n. 1579, p. 2748–55, 12 out. 2011.

ALEXANDRE, M. A et al. Severe Plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 10, p. 1611–4, out. 2010.

ALEY, S. B. et al. Synthetic peptides from the circumsporozoite proteins of Plasmodium falciparum and Plasmodium knowlesi recognize the human hepatoma cell line HepG2-A16 in vitro. **The Journal of experimental medicine**, v. 164, n. 6, p. 1915–22, 1 dez. 1986.

ALVING, C. R. et al. Adjuvants for human vaccines. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 3, p. 310–5, jun. 2012.

AMINO, R. et al. Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. **Nature medicine**, v. 12, n. 2, p. 220–4, fev. 2006.

AMINO, R.; MÉNARD, R.; FRISCHKNECHT, F. In vivo imaging of malaria parasites-recent advances and future directions. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 4, p. 407–14, ago. 2005.

ANCSIN, J. B.; KISILEVSKY, R. A binding site for highly sulfated heparan sulfate is identified in the N terminus of the circumsporozoite protein: significance for malarial sporozoite attachment to hepatocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 21, p. 21824–32, 21 maio 2004.

ANDERS, R. F. et al. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with Plasmodium chabaudi. **Vaccine**, v. 16, n. 2-3, p. 240–7, 1998.

ARÉVALO-HERRERA, M.; CHITNIS, C.; HERRERA, S. Current status of Plasmodium vivax vaccine. **Human vaccines**, v. 6, n. 1, p. 124–32, jan. 2010.

ARNOT, D. E. et al. Circumsporozoite protein of Plasmodium vivax: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science (New York, N.Y.)**, v. 230, n. 4727, p. 815–8, 15 nov. 1985.

ARNOT, D. E.; BARNWELL, J. W.; STEWART, M. J. Does biased gene conversion influence polymorphism in the circumsporozoite protein-encoding gene of Plasmodium vivax? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 21, p. 8102–6, nov. 1988.

ARNOTT, A. et al. Global Population Structure of the Genes Encoding the Malaria Vaccine Candidate, Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA1). **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 10, p. e2506, jan. 2013.

ARRUDA, M. E. et al. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 367–371, 2007.

ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Journal of immunology**, v. 169, n. 6, p. 2956–63, 15 set. 2002.

AVRIL, T. et al. Not all polyriboinosinic-polyribocytidylic acids (Poly I:C) are equivalent for inducing maturation of dendritic cells: implication for alpha-type-1 polarized DCs. **Journal of immunotherapy**, v. 32, n. 4, p. 353–62, maio 2009.

BACCARELLA, A. et al. Toll-like receptor 7 mediates early innate immune responses to malaria. **Infection and immunity**, v. 81, n. 12, p. 4431–42, dez. 2013.

BAI, T. et al. Structure of AMA1 from Plasmodium falciparum reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 36, p. 12736–41, 6 set. 2005.

BARGIERI, D. Y. et al. New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FliC flagellin. **Vaccine**, v. 26, n. 48, p. 6132–6142, 2008.

BELL, B. A. et al. Process development for the production of an E. coli produced clinical grade recombinant malaria vaccine for Plasmodium vivax. **Vaccine**, v. 27, n. 9, p. 1448–1453, 2009.

BISWAS, S. et al. Transgene optimization, immunogenicity and in vitro efficacy of viral vectored vaccines expressing two alleles of Plasmodium falciparum AMA1. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e20977, jan. 2011.

BITENCOURT, A. R. et al. Antigenicity and immunogenicity of Plasmodium vivax merozoite surface protein-3. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56061, jan. 2013.

BÖHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. **Protein engineering**, v. 5, n. 3, p. 191–195, 1992.

BOUHAROUN-TAYOUN, H.; DRUILHE, P. Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87 Suppl 3, p. 229–34, jan. 1992a.

BOUHAROUN-TAYOUN, H.; DRUILHE, P. Plasmodium falciparum malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. **Infection and immunity**, v. 60, n. 4, p. 1473–81, abr. 1992b.

BOUILLET, L. É. M. et al. Long-term humoral and cellular immune responses elicited by a heterologous Plasmodium vivax apical membrane antigen 1 protein

prime/adenovirus boost immunization protocol. **Infection and immunity**, v. 79, n. 9, p. 3642–52, set. 2011.

BOWMAN, N. M. et al. Comparative population structure of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein NANP repeat lengths in Lilongwe, Malawi. **Scientific reports**, v. 3, p. 1990, jan. 2013.

BURNS, J. M. et al. Immunization against Plasmodium chabaudi malaria using combined formulations of apical membrane antigen-1 and merozoite surface protein-1. **Vaccine**, v. 21, n. 17-18, p. 1843–52, 16 maio 2003.

BUTLER, D. Mosquitoes score in chemical war. **Nature**, v. 475, n. 7354, p. 19, 7 jul. 2011.

CAMACHO, A. G. A. et al. TLR5-dependent immunogenicity of a recombinant fusion protein containing an immunodominant epitope of malarial circumsporozoite protein and the FliC flagellin of Salmonella Typhimurium. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106 Suppl , p. 167–171, 2011.

CAMPO, J. J. et al. Duration of vaccine efficacy against malaria: 5th year of follow-up in children vaccinated with RTS,S/AS02 in Mozambique. **Vaccine**, v. 32, n. 19, p. 2209–16, 11 mar. 2014.

CASALE, P. A. O. Caracterização da resposta imune celular induzida pela imunização experimental com antígenos recombinantes de Plasmodium vivax Patricia Ostermayer Athayde Casale Caracterização da resposta imune celular induzida pela imunização experimental com antígenos. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

CERAMI, C. et al. The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum sporozoites. **Cell**, v. 70, n. 6, p. 1021–33, 18 set. 1992.

CHESNE-SECK, M.-L. et al. Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 144, n. 1, p. 55–67, nov. 2005.

CHOI, H. J. et al. Retinal haemorrhage in vivax malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 6, p. 387–389, 2004.

CLYDE, D. F. Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, 1971-75. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68 Suppl, p. 9–12, jan. 1990.

COCHRANE, A. H. et al. Widespread reactivity of human sera with a variant repeat of the circumsporozoite protein of Plasmodium vivax. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n. 5, p. 446–451, 1990.

COELHO, H. C. C. et al. Thrombocytopenia in Plasmodium vivax Malaria Is Related to Platelets Phagocytosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

COLEY, A. M. et al. Structure of the malaria antigen AMA1 in complex with a growth-inhibitory antibody. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 9, p. 1308–19, 7 set. 2007.

COLLINS, W. E. et al. Immunization of Saimiri sciureus boliviensis with recombinant vaccines based on the circumsporozoite protein of Plasmodium vivax. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 5, p. 455–464, 1989.

COLLINS, W. E. et al. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of Plasmodium fragile. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 51, n. 6, p. 711–9, dez. 1994.

COSTA, F. T. M. et al. On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: perspectives from the Brazilian field. **International journal for parasitology**, v. 42, n. 12, p. 1099–105, nov. 2012.

CREWTHER, P. E. et al. Plasmodium falciparum: Two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. **Experimental Parasitology**, v. 70, n. 2, p. 193–206, 1990.

CUNHA, M. G.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the Plasmodium vivax vaccine candidate MSP1(19) expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine**, v. 20, n. 3-4, p. 385–96, nov. 2001.

CURADO, I. et al. Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (Plasmodium vivax and Plasmodium malariae/P. brasilianum) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 235–43, 1997.

DAME, J. B. et al. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. **Science**, v. 225, n. 4662, p. 593–9, 10 ago. 1984.

DANIEL-RIBEIRO, C. T.; LACERDA, M. V. G.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon: some aspects of its epidemiology, clinical spectrum and naturally induced immune responses. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)**, v. 101, n. 3, p. 243–248, 2008.

DE CASSAN, S. C. et al. The requirement for potent adjuvants to enhance the immunogenicity and protective efficacy of protein vaccines can be overcome by prior immunization with a recombinant adenovirus. **Journal of immunology**, v. 187, n. 5, p. 2602–16, 1 set. 2011.

DEANS, J. A. et al. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, Plasmodium knowlesi 66 kD merozoite antigen. **Parasite immunology**, v. 10, n. 5, p. 535–52, set. 1988.

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired immunity to malaria. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 1, p. 13–36, Table of Contents, jan. 2009.

DOOLAN, D. L.; HOFFMAN, S. L. DNA-based vaccines against malaria: status and promise of the Multi-Stage Malaria DNA Vaccine Operation. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 8, p. 753–62, jun. 2001.

DOOLAN, D. L.; MARTINEZ-ALIER, N. Immune response to pre-erythrocytic stages of malaria parasites. **Current molecular medicine**, v. 6, n. 2, p. 169–85, mar. 2006.

DREW, D. R. et al. Defining the antigenic diversity of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and the requirements for a multi-allele vaccine against malaria. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51023, jan. 2012.

DRUILHE, P. et al. A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill Plasmodium falciparum. **PLoS medicine**, v. 2, n. 11, p. e344, nov. 2005.

DUTTA, S. et al. Mode of Action of Invasion-Inhibitory Antibodies Directed against Apical Membrane Antigen 1 of Plasmodium falciparum. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 2116–2122, 2005.

EPSTEIN, J. E. et al. Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic CD8⁺ T cell immunity. **Science**, v. 334, n. 6055, p. 475–80, 28 out. 2011.

ESCALANTE, A. A. et al. Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of Plasmodium falciparum. X. Asembo Bay Cohort Project. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 113, n. 2, p. 279–287, 2001.

ESEN, M. et al. Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. **Vaccine**, v. 27, n. 49, p. 6862–8, 16 nov. 2009.

ESPINOSA, D. A. et al. Development of a Chimeric Plasmodium berghei Strain Expressing the Repeat Region of the P. vivax Circumsporozoite Protein for In Vivo Evaluation of Vaccine Efficacy. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 8, p. 2882–2887, 2013.

FABER, B. W. et al. Diversity covering AMA1-MSP119 fusion proteins as malaria vaccines. **Infection and immunity**, v. 81, n. 5, p. 1479–90, maio 2013.

FERRARO, B. et al. Inducing humoral and cellular responses to multiple sporozoite and liver-stage malaria antigens using exogenous plasmid DNA. **Infection and immunity**, v. 81, n. 10, p. 3709–20, out. 2013.

FINNEY, O. C.; RILEY, E. M.; WALTHER, M. Regulatory T cells in malaria--friend or foe? **Trends in immunology**, v. 31, n. 2, p. 63–70, fev. 2010.

FORBES, E. K. et al. Combining liver- and blood-stage malaria viral-vectored vaccines: investigating mechanisms of CD8+ T cell interference. **Journal of immunology**, v. 187, n. 7, p. 3738–50, 1 out. 2011.

GALINSKI, M. R. et al. The circumsporozoite gene of the Plasmodium cynomolgi complex. **Cell**, v. 48, n. 2, p. 311–9, 30 jan. 1987.

GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. Plasmodium vivax: who cares? **Malaria journal**, v. 7 Suppl 1, p. S9, 2008.

GARCIA, L. S. Malaria. Clinics in laboratory medicine, v. 30, n. 1, p. 93–129, mar. 2010.

GARÇON, N.; HEPPNER, D. G.; COHEN, J. Development of RTS,S/AS02: a purified subunit-based malaria vaccine candidate formulated with a novel adjuvant. **Expert review of vaccines**, v. 2, n. 2, p. 231–8, abr. 2003.

GENTIL, F. et al. A recombinant vaccine based on domain II of Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice. **Vaccine**, v. 28, n. 38, p. 6183–6190, 2010.

GENTON, B. et al. Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against Plasmodium falciparum in Papua New Guinean children. **Vaccine**, v. 22, n. 1, p. 30–41, 8 dez. 2003.

GHOSH, A. K.; JACOBS-LORENA, M. Plasmodium sporozoite invasion of the mosquito salivary gland. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 394–400, 2009.

GIOVANNINI, D. et al. Independent roles of apical membrane antigen 1 and rhoptry neck proteins during host cell invasion by apicomplexa. **Cell host & microbe**, v. 10, n. 6, p. 591–602, dez. 2011.

GIRARD, M. P. et al. A review of human vaccine research and development: malaria. **Vaccine**, v. 25, n. 9, p. 1567–80, 19 fev. 2007.

GONZÁLEZ, J. M. et al. Variants of the Plasmodium vivax circumsporozoite protein (VK210 and VK247) in Colombian isolates. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 709–712, 2001.

GOOD, M. F.; DOOLAN, D. L. Malaria vaccine design: immunological considerations. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 555–66, 29 out. 2010.

GOPINATH, R. et al. Failure to detect a Plasmodium vivax-like malaria parasite in globally collected blood samples. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 6, p. 1630–1633, 1994.

GREENWOOD, B. Malaria vaccines. Evaluation and implementation. **Acta tropica**, v. 95, n. 3, p. 298–304, set. 2005.

GUINOVART, C. et al. Insights into long-lasting protection induced by RTS,S/AS02A malaria vaccine: further results from a phase IIb trial in Mozambican children. **PloS one**, v. 4, n. 4, p. e5165, jan. 2009.

GUPTA, R. K. et al. Adjuvants--a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, v. 11, n. 3, p. 293–306, jan. 1993.

HAFALLA, J. C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 297–316, mar. 2011.

HEALER, J. et al. Independent Translocation of Two Micronemal Proteins in Developing Plasmodium falciparum Merozoites. **Infection and immunity**, v. 70, n. 10, p. 5751–5758, 2002.

HERRERA, S. et al. Safety and elicitation of humoral and cellular responses in colombian malaria-naive volunteers by a Plasmodium vivax circumsporozoite protein-derived synthetic vaccine. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 73, n. 5 Suppl, p. 3–9, nov. 2005.

HERRERA, S.; CORRADIN, G.; ARÉVALO-HERRERA, M. An update on the search for a Plasmodium vivax vaccine. **Trends in parasitology**, v. 23, n. 3, p. 122–8, mar. 2007.

HERRINGTON, D. A. et al. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against Plasmodium falciparum sporozoites. **Nature**, v. 328, n. 6127, p. 257–9, 1987.

HILL, A. V. S. Vaccines against malaria. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 366, n. 1579, p. 2806–14, 12 out. 2011.

HODDER, A. N. et al. The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 46, p. 29446–29452, 1996.

HODDER, A. N.; CREWTHER, P. E.; ANDERS, R. F. Specificity of the Protective Antibody Response to Apical Membrane Antigen 1. **Infection and immunity**, v. 69, n. 5, p. 3286–3294, 2001.

HOFFMAN, S. L. et al. Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoites. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 8, p. 1155–64, 15 abr. 2002.

HOFFMAN, S. L.; DOOLAN, D. L. Can malaria DNA vaccines on their own be as immunogenic and protective as prime-boost approaches to immunization? **Developments in biologicals**, v. 104, p. 121–32, jan. 2000.

HOLLINGDALE, M. R. et al. Inhibition of entry of Plasmodium falciparum and P. vivax sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 132, n. 2, p. 909–13, fev. 1984.

HOLLINGDALE, M. R. Anti-sporozoite antibodies. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68 Suppl, p. 47–51, jan. 1990.

HOWELL, S. A et al. Proteolytic processing and primary structure of Plasmodium falciparum apical membrane antigen-1. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 33, p. 31311–20, 17 ago. 2001.

HOWELL, S. A. et al. A single malaria merozoite serine protease mediates shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 26, p. 23890–23898, 2003.

IMWONG, M. et al. Limited Polymorphism in the Dihydropteroate Synthetase Gene (dhps) of Plasmodium vivax Isolates from Thailand. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4393–4395, 2005.

JIANG, G. et al. Induction of multi-antigen multi-stage immune responses against Plasmodium falciparum in rhesus monkeys, in the absence of antigen interference, with heterologous DNA prime/poxvirus boost immunization. **Malaria journal**, v. 6, p. 135, jan. 2007.

JIMENEZ, M. C. S. et al. Biophysical characterization of the recombinant merozoite surface protein-3 of Plasmodium vivax. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1780, n. 7-8, p. 983–8, 2008.

JONES, M. K.; GOOD, M. F. Malaria parasites up close. **Nature medicine**, v. 12, n. 2, p. 170–1, fev. 2006.

KAIN, K. C. et al. Serologic and genetic characterization of Plasmodium vivax from whole blood-impregnated filter paper discs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 4, p. 473–479, 1992.

KANTELE, A.; JOKIRANTA, T. S. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, Plasmodium knowlesi. **Clinical infectious diseases**, v. 52, n. 11, p. 1356–62, jun. 2011.

KASHALA, O. et al. Safety, tolerability and immunogenicity of new formulations of the Plasmodium falciparum malaria peptide vaccine SPf66 combined with the immunological adjuvant QS-21. **Vaccine**, v. 20, n. 17-18, p. 2263–2277, 2002.

KASTURI, S. P. et al. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. **Nature**, v. 470, n. 7335, p. 543–7, 24 fev. 2011.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1143, p. 1–20, nov. 2008.

KESTER, K. E. et al. A phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy bridging randomized study of a two-dose regimen of liquid and lyophilized formulations of the candidate malaria vaccine RTS,S/AS02A in malaria-naïve adults. **Vaccine**, v. 25, n. 29, p. 5359–66, 20 jul. 2007.

KESTER, K. E. et al. Phase 2a trial of 0, 1, and 3 month and 0, 7, and 28 day immunization schedules of malaria vaccine RTS,S/AS02 in malaria-naïve adults at the Walter Reed Army Institute of Research. **Vaccine**, v. 26, n. 18, p. 2191–202, abr. 2008.

KESTER, K. E. et al. Randomized, double-blind, phase 2a trial of falciparum malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naive adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 3, p. 337–46, 1 ago. 2009.

KOCHAR, D. K. et al. Plasmodium vivax malaria. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 132–134, 2005.

KOCKEN, C. H. et al. 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. **Infection and immunity**, v. 67, n. 1, p. 43–9, jan. 1999.

KOCKEN, C. H. M. et al. High-Level Expression of the Malaria Blood-Stage Vaccine Candidate Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 and Induction of Antibodies That Inhibit Erythrocyte Invasion. **Infection and immunity**, v. 70, n. 8, p. 4471–4476, 2002.

KRETTLI, A. U.; DANTAS, L. A. Which routes do Plasmodium sporozoites use for successful infections of vertebrates? **Infection and immunity**, v. 68, n. 5, p. 3064–5, maio 2000.

LACERDA, M. V. G. et al. Thrombocytopenia in malaria: who cares? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106 Suppl , n. Batista 1946, p. 52–63, ago. 2011.

LACERDA, M. V. G. et al. Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. **Malaria journal**, v. 11, p. 12, jan. 2012.

LALITHA, P. V et al. Production of the Subdomains of the Plasmodium falciparum Apical Membrane Antigen 1 Ectodomain and Analysis of the Immune Response. **Infection and immunity**, v. 72, n. 8, p. 4464–4470, 2004.

LANGERMANS, J. A. M. et al. Preclinical evaluation of a chimeric malaria vaccine candidate in Montanide ISA 720: immunogenicity and safety in rhesus macaques. **Human vaccines**, v. 2, n. 5, p. 222–6, 2006.

LEAL, M. T. A. et al. Immunogenicity of recombinant proteins consisting of Plasmodium vivax circumsporozoite protein allelic variant-derived epitopes fused with Salmonella enterica Serovar Typhimurium flagellin. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 20, n. 9, p. 1418–25, set. 2013.

LEE, K.-S. et al. Plasmodium knowlesi from archival blood films: further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo. **International journal for parasitology**, v. 39, n. 10, p. 1125–8, ago. 2009.

LUMSDEN, J. M. et al. Evaluation of the Safety and Immunogenicity in Rhesus Monkeys of a Recombinant Malaria Vaccine for Plasmodium vivax with a Synthetic Toll-Like Receptor 4 Agonist Formulated in an Emulsion. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 9, p. 3492–3500, 2011.

LUMSDEN, J. M. et al. Evaluation of immune responses to a Plasmodium vivax CSP-based recombinant protein vaccine candidate in combination with second-generation adjuvants in mice. **Vaccine**, v. 30, n. 22, p. 3311–9, 9 maio 2012.

MACHADO, R. L. D. et al. Correlation between Plasmodium vivax variants in Belém, Pará State, Brazil and symptoms and clearance of parasitaemia. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 175–7, jun. 2003.

MACHADO, R. L.; PÓVOA, M. M. Distribution of Plasmodium vivax variants (VK210, VK247 and P. vivax-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 4, p. 377–381, 2000.

MAHAJAN, B. et al. Multiple antigen peptide vaccines against Plasmodium falciparum malaria. **Infection and immunity**, v. 78, n. 11, p. 4613–24, nov. 2010.

MALERA CONSULTATIVE GROUP ON VACCINES. A research agenda for malaria eradication: vaccines. **PLoS medicine**, v. 8, n. 1, p. e1000398, jan. 2011.

MALKIN, E. et al. Phase 1 study of two merozoite surface protein 1 (MSP1(42)) vaccines for Plasmodium falciparum malaria. **PLoS clinical trials**, v. 2, n. 4, p. e12, jan. 2007.

MBOW, M. L. et al. New adjuvants for human vaccines. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 3, p. 411–6, jun. 2010.

MCCONKEY, S. J. et al. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, p. 729–35, jun. 2003.

MCCUTCHAN, T. F. et al. Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarias: biological and phylogenetic implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 21, p. 11889–94, 15 out. 1996.

MCKEE, A. S. et al. Alum induces innate immune response through macrophage and mast cell sensors, but these are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. **J immunol.**, v. 183, n. 7, p. 4403–4414, 2010.

MIAN, M. F. et al. Length of dsRNA (poly I:C) drives distinct innate immune responses, depending on the cell type. **Journal of leukocyte biology**, v. 94, n. 5, p. 1025–36, nov. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia prático de tratamento da malária no Brasil Guia prático de tratamento da malária no Brasil. [s.l: s.n.].

MITCHELL, G. H. et al. Apical Membrane Antigen 1, a Major Malaria Vaccine Candidate, Mediates the Close Attachment of Invasive Merozoites to Host Red Blood Cells. **Infection and immunity**, v. 72, n. 1, p. 154–158, 2004.

MIURA, K. et al. Overcoming allelic specificity by immunization with five allelic forms of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1. **Infection and immunity**, v. 81, n. 5, p. 1491–501, 1 maio 2013.

MOON, J. J. et al. Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand T fh cells and promote germinal center induction. **PNAS**, v. 109, n. 4, p. 1–6, 2011.

MOON, J. J. et al. Antigen-displaying lipid-enveloped PLGA nanoparticles as delivery agents for a Plasmodium vivax malaria vaccine. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31472, jan. 2012.

MORAIS, C. G. et al. Antibodies to Plasmodium vivax apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 4, p. 582–7, out. 2006.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. **The Lancet infectious diseases**, v. 9, n. 9, p. 555–66, set. 2009.

MUELLER, I. et al. Natural acquisition of immunity to Plasmodium vivax: epidemiological observations and potential targets. **Advances in parasitology**, v. 81, p. 77–131, jan. 2013.

MÚFALO, B. C. et al. Plasmodium vivax apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 10, n. 12-13, p. 1266–73, out. 2008.

NARDIN, E. H. et al. Circumsporozoite proteins of human malaria parasites Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. **The Journal of experimental medicine**, v. 156, n. 1, p. 20–30, 1 jul. 1982.

NARDIN, E. H.; NUSSENZWEIG, R. S. T cell responses to of malaria: Role in Protection and Vaccine Development Against. **Annu. Rev. Immunol.**, n. 11, p. 687–727, 1993.

NEAFSEY, D. E. et al. The malaria parasite Plasmodium vivax exhibits greater genetic diversity than Plasmodium falciparumNature Genetics, 2012.

NOSSAL, G. J. V. Vaccines of the future. **Vaccine**, v. 29 Suppl 4, n. September, p. D111–5, 30 dez. 2011.

NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V. Antisporozoite vaccine for malaria: experimental basis and current status. **Reviews of infectious diseases**, v. 11 Suppl 3, p. S579–85, 1989.

NUSSENZWEIG RS, VANDERBERG J, MOST H. protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. **Nature**, v. 216, n. Out 14, p. 160–2, 1967.

OCKENHOUSE, C. F. et al. Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for Plasmodium falciparum malaria. **The Journal of infectious diseases**, v. 177, n. 6, p. 1664–73, jun. 1998.

OLIVEIRA, G. A. et al. Safety and enhanced immunogenicity of a hepatitis B core particle Plasmodium falciparum malaria vaccine formulated in adjuvant Montanide ISA 720 in a phase I trial. **Infection and immunity**, v. 73, n. 6, p. 3587–97, jun. 2005.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of P. vivax (VK210, VK247 and P. vivax-like) in individuals naturally exposed to malaria. **Acta tropica**, v. 92, n. 1, p. 63–9, set. 2004.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. Malaria in Brazil: an overview Review. **Malaria journal**, v. 9, n. 115, p. 1–15, 2010.

OLOTU, A. et al. Four-year efficacy of RTS,S/AS01E and its interaction with malaria exposure. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 12, p. 1111–20, 21 mar. 2013.

ORD, R. L.; TAMI, A.; SUTHERLAND, C. J. ama1 genes of sympatric Plasmodium vivax and P. falciparum from Venezuela differ significantly in genetic diversity and recombination frequency. **PloS one**, v. 3, n. 10, p. e3366, jan. 2008.

OSIER, F. H. A. et al. Allelic diversity and naturally acquired allele-specific antibody responses to Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 in Kenya. **Infection and immunity**, v. 78, n. 11, p. 4625–4633, 2010.

PAN, W. et al. Fusion of two malaria vaccine candidate antigens enhances product yield, immunogenicity, and antibody-mediated inhibition of parasite growth in vitro. **Journal of immunology**, v. 172, n. 10, p. 6167–74, 15 maio 2004.

PANCAKE, S. J. et al. Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. **The Journal of cell biology**, v. 117, n. 6, p. 1351–7, jun. 1992.

PARAKH, A. et al. Plasmodium vivax malaria in children: uncommon manifestations. **Annals of tropical paediatrics**, v. 29, n. 4, p. 253–6, dez. 2009.

PEREIRA, M. DE O. Analysis of the immune response induced by experimental immunization with recombinant antigens of Plasmodium vivax. [s.l.] Universidade de São Paulo, 28 jun. 2012.

PERRET, R. et al. Adjuvants that improve the ratio of antigen-specific effector to regulatory T cells enhance tumor immunity. **Cancer research**, v. 73, n. 22, p. 6597–608, 15 nov. 2013.

PICHYANGKUL, S. et al. Evaluation of the safety and immunogenicity of Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1, merozoite surface protein 1 or

RTS,S vaccines with adjuvant system AS02A administered alone or concurrently in rhesus monkeys. **Vaccine**, v. 28, n. 2, p. 452–62, 11 dez. 2009.

PIZARRO, J. C. et al. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science**, v. 308, n. 5720, p. 408–11, 15 abr. 2005.

PLASSMEYER, M. L. et al. Structure of the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein, a leading malaria vaccine candidate. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 39, p. 26951–63, 25 set. 2009.

POLHEMUS, M. E. et al. Evaluation of RTS,S/AS02A and RTS,S/AS01B in adults in a high malaria transmission area. **PloS one**, v. 4, n. 7, p. e6465, jan. 2009.

POTOCNJAK, P. et al. Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 151, n. 6, p. 1504–13, 1 jun. 1980.

PRAKASH, J. et al. Acute renal failure in Plasmodium vivax malaria. **J Assoc Physicians India**, v. 51, p. 265–267, 2003.

PRIEUR, E. et al. A Plasmodium falciparum candidate vaccine based on a six-antigen polyprotein encoded by recombinant poxviruses. **PNAS**, v. 101, n. 1, p. 290–5, 6 jan. 2004.

PUTAPORNTIP, C. et al. Nucleotide sequence polymorphism at the apical membrane antigen-1 locus reveals population history of Plasmodium vivax in Thailand. **Infection, genetics and evolution**, v. 9, n. 6, p. 1295–300, dez. 2009.

QARI, S. H. et al. Wide distribution of the variant form of the human malaria parasite Plasmodium vivax. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 25, p. 16297–16300, 1991.

QARI, S. H. et al. Global occurrence of Plasmodium vivax-like human malaria parasite. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 6, p. 1485–1489, 1993a.

QARI, S. H. et al. Identification of Plasmodium vivax-like human malaria parasite. **Lance**, v. 341, n. 8848, p. 780–783, 1993b.

QARI, S. H. et al. A study of polymorphism in the circumsporozoite protein of human malaria parasites. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 1, p. 45–51, 1994.

RAMOS, C. H. I. et al. Stability and folding studies of the N-domain of troponin C. Evidence for the formation of an intermediate. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 427, n. 2, p. 135–42, 15 jul. 2004.

RATHORE, D. et al. An immunologically cryptic epitope of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein facilitates liver cell recognition and induces protective antibodies that block liver cell invasion. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 21, p. 20524–9, 27 maio 2005.

REED, Z. H.; FRIEDE, M.; KIENY, M. P. Malaria vaccine development: progress and challenges. **Current molecular medicine**, v. 6, n. 2, p. 231–45, mar. 2006.

REMARQUE, E. J. et al. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in reviewTrends in Parasitology, 2008a.

REMARQUE, E. J. et al. A diversity-covering approach to immunization with Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 induces broader allelic recognition and growth inhibition responses in rabbits. **Infection and immunity**, v. 76, n. 6, p. 2660–70, jun. 2008b.

RÉNIA, L. et al. Effector functions of circumsporozoite peptide-primed CD4+ T cell clones against Plasmodium yoelii liver stages. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 150, n. 4, p. 1471–8, 15 mar. 1993.

REYES-SANDOVAL, A. et al. Prime-boost immunization with adenoviral and modified vaccinia virus Ankara vectors enhances the durability and polyfunctionality of protective malaria CD8+ T-cell responses. **Infection and immunity**, v. 78, n. 1, p. 145–53, jan. 2010.

RICHARDS, J. S.; BEESON, J. G. The future for blood-stage vaccines against malaria. **Immunology and cell biology**, v. 87, n. 5, p. 377–90, jul. 2009.

RIECKMANN, K. H. et al. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 57 Suppl 1, p. 261–5, jan. 1979.

RILEY, E. M. et al. Regulating immunity to malaria. **Parasite immunology**, v. 28, n. 1-2, p. 35–49, 2006.

RILEY, E. M.; STEWART, V. A. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. **Nature medicine**, v. 19, n. 2, p. 168–78, fev. 2013.

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

RODRIGUES, M. M. et al. CD8+ cytolytic T cell clones derived against the Plasmodium yoelii circumsporozoite protein protect against malaria. **International immunology**, v. 3, n. 6, p. 579–585, 1991.

RODRIGUES, M. M.; DUTRA, A. P.; YOSHIDA, N. Cellular immune response of humans to the circumsporozoite protein of Plasmodium vivax. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 153–158, 1991.

ROESTENBERG, M. et al. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 5, p. 468–77, 30 jul. 2009.

ROESTENBERG, M. et al. Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. **Lancet**, v. 377, n. 9779, p. 1770–6, 21 maio 2011.

ROGERS, W. O. et al. Protection of Rhesus Macaques against Lethal Plasmodium knowlesi Malaria by a Heterologous DNA Priming and Poxvirus Boosting Immunization Regimen. **Infection and immunity**, v. 70, n. 8, p. 4329–4335, 2002.

ROMERO, P. et al. Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. **Nature**, v. 341, n. 6240, p. 323–6, 28 set. 1989.

ROSA, D. S. et al. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. **Immunology letters**, v. 92, n. 3, p. 259–68, 15 abr. 2004.

ROSENBERG, R. et al. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite Plasmodium vivax. **Science**, v. 245, n. 4921, p. 973–6, 1 set. 1989.

SABCHAREON, A. et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. The American journal of tropical medicine and hygiene. [s.l: s.n.].

SARKAR, S. K. et al. Occurrence, distribution and possible sources of organochlorine pesticide residues in tropical coastal environment of India: an overview. **Environment international**, v. 34, n. 7, p. 1062–71, out. 2008.

SEDEGAH, M. et al. Reduced immunogenicity of DNA vaccine plasmids in mixtures. **Gene therapy**, v. 11, n. 5, p. 448–56, mar. 2004.

SEDEGAH, M. et al. Adenovirus 5-vectored P. falciparum vaccine expressing CSP and AMA1. Part A: safety and immunogenicity in seronegative adults. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e24586, jan. 2011.

SIDJANSKI, S.; VANDERBERG, J. P. Delayed migration of Plasmodium sporozoites from the mosquito bite site to the blood. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 57, n. 4, p. 426–9, out. 1997.

SILVIE, O. et al. A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, p. 9490–6, 2004.

SINGH, B. et al. A hybrid multistage protein vaccine induces protective immunity against murine malaria. **Infection and immunity**, v. 80, n. 4, p. 1491–501, abr. 2012.

SINGH, B.; DANESHVAR, C. Human Infections and Detection of Plasmodium knowlesi. **Clinical microbiology reviews**, n. September 2013, p. 2938, 2013.

SINNIS, P. et al. Remnant lipoproteins inhibit malaria sporozoite invasion of hepatocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 3, p. 945–54, 1 set. 1996.

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

SPENCE, P. J.; LANGHORNE, J. T cell control of malaria pathogenesis. **Current opinion in immunology**, v. 24, n. 4, p. 444–8, ago. 2012.

SPRING, M. D. et al. Phase 1/2a study of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen-1 (AMA-1) administered in adjuvant system AS01B or AS02A. **PloS one**, v. 4, n. 4, p. e5254, jan. 2009.

SRINIVASAN, P. et al. Binding of Plasmodium merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 32, p. 13275–80, 9 ago. 2011.

STAHL-HENNIG, C. et al. Synthetic double-stranded RNAs are adjuvants for the induction of T helper 1 and humoral immune responses to human papillomavirus in rhesus macaques. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000373, abr. 2009.

STEVENSON, M. M.; RILEY, E. M. Innate immunity to malaria. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 3, p. 169–180, 2004.

STEWART, M. J. et al. Plasmodium berghei sporozoite invasion is blocked in vitro by sporozoite-immobilizing antibodies. **Infection and immunity**, v. 51, n. 3, p. 859–64, mar. 1986.

STORTI-MELO, L. M. et al. Plasmodium vivax circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 7, p. 672–678, 2009.

STURM, A. et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1287–90, 1 set. 2006.

TAKALA, S. L. et al. Extreme polymorphism in a vaccine antigen and risk of clinical malaria: implications for vaccine development. **Science translational medicine**, v. 1, n. 2, p. 2ra5, 2009.

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

TAMMINGA, C. et al. Adenovirus-5-vectored P. falciparum vaccine expressing CSP and AMA1. Part B: safety, immunogenicity and protective efficacy of the CSP component. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e25868, jan. 2011.

TARGETT, G. A; GREENWOOD, B. M. Malaria vaccines and their potential role in the elimination of malaria. **Malaria journal**, v. 7 Suppl 1, p. S10, jan. 2008.

TEIXEIRA, L. H. et al. Immunogenicity of a Prime-Boost Vaccine Containing the Circumsporozoite Proteins of Plasmodium vivax in Rodents. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 793–807, 9 dez. 2014.

TEWARI, K. et al. Poly (I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4+ T cell responses to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein (CSP) and DEC-CSP in non human primates. **Vaccine**, v. 28, n. 45, p. 7256–7266, 2010.

TEWARI, R. et al. Function of region I and II adhesive motifs of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein in sporozoite motility and infectivity. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 49, p. 47613–8, 6 dez. 2002.

THERA, M. A; PLOWE, C. V. Vaccines for malaria: how close are we? **Annual review of medicine**, v. 63, n. October 2011, p. 345–57, jan. 2012.

THERA, M. A. et al. A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 11, p. 1004–1013, 2011.

THOMAS, A. W. et al. High prevalence of natural antibodies against Plasmodium falciparum 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme-linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 51, n. 6, p. 730–40, dez. 1994.

TRIGLIA, T. et al. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by Plasmodium species. **Molecular microbiology**, v. 38, n. 4, p. 706–18, nov. 2000.

TSUJI, M. A retrospective evaluation of the role of T cells in the development of malaria vaccine. **Experimental parasitology**, v. 126, n. 3, p. 421–5, nov. 2010.

U.S.A.M.R.M.C. **Study of VMP001 and AS01B in Healthy Malaria-Naïve Adults**. Disponível em: <(http://clinicaltrials.gov/ct2/>.

VANDERBERG, J. P. Studies on the motility of Plasmodium sporozoites. **The Journal of protozoology**, v. 21, n. 4, p. 527–537, 1974.

VANDERBERG, J. P.; STEWART, M. J. Plasmodium sporozoite-host cell interactions during sporozoite invasion. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 68 Suppl, p. 74–79, 1990.

VANLOUBBEECK, Y. et al. Comparison of the immune responses induced by soluble and particulate Plasmodium vivax circumsporozoite vaccine candidates formulated in AS01 in rhesus macaques. **Vaccine**, v. 31, n. 52, p. 6216–24, 16 dez. 2013.

VICENTIN, E. C. et al. Invasion-Inhibitory Antibodies Elicited by Immunization with Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen-1 Expressed in Pichia pastoris Yeast. **Infection and immunity**, v. 82, n. 3, p. 1296–307, mar. 2014.

WALTHER, M. Advances in vaccine development against the pre-erythrocytic stage of Plasmodium falciparum malaria. **Expert review of vaccines**, v. 5, n. 1, p. 81–93, fev. 2006.

WEBSTER, D. P. et al. Safety of recombinant fowlpox strain FP9 and modified vaccinia virus Ankara vaccines against liver-stage P. falciparum malaria in non-immune volunteers. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 3026–34, 5 abr. 2006.

WESTENBERGER, S. J. et al. A systems-based analysis of Plasmodium vivax lifecycle transcription from human to mosquito. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, 2010.

WHITE, M. T. et al. The relationship between RTS,S vaccine-induced antibodies, CD4⁺ T cell responses and protection against Plasmodium falciparum infection. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61395, jan. 2013a.

WHITE, N. J. Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 2, p. 172–3, 15 jan. 2008.

WHITE, N. J. A vaccine for malaria. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 20, p. 1926–7, 17 nov. 2011.

WHITE, N. J. et al. Malaria. Lancet, 15 ago. 2013b.

WHO. Malaria. World Malaria Report, 8 ago. 2013.

YADAVA, A. et al. A novel chimeric Plasmodium vivax circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. **Infection and immunity**, v. 75, n. 3, p. 1177–85, mar. 2007.

YADAVA, A. et al. Cross-species immunity following immunization with a circumsporozoite protein-based vaccine for malaria. **The Journal of infectious diseases**, v. 205, n. 9, p. 1456–63, 1 maio 2012.

YANG, C. et al. Induction of protective antibodies in Saimiri monkeys by immunization with a multiple antigen construct (MAC) containing the Plasmodium vivax circumsporozoite protein repeat region and a universal T helper epitope of tetanus toxin. **Vaccine**, v. 15, n. 4, p. 377–86, mar. 1997.

YOELI, M. MOVEMENT OF THE SPOROZOITES OF PLASMODIUM BERGHEI (VINCKE ET LIPS, 1948). **Nature**, v. 201, p. 1344–5, 28 mar. 1964.

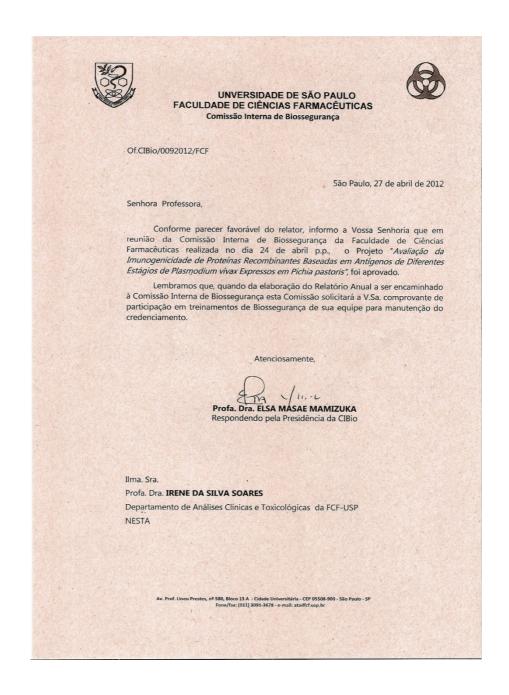
YOSHIDA, N. et al. Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporozoite stage of malaria parasite. **Science**, v. 207, n. 4426, p. 71–3, 4 jan. 1980.

ZAKERI, S. et al. Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical Plasmodium vivax isolates from Iran. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, v. 11, n. 5, p. 729–37, maio 2006.

ZHANG, Q. et al. Construction and evaluation of a multistage combination vaccine against malaria. **Vaccine**, v. 25, n. 11, p. 2112–9, 1 mar. 2007.

ANEXOS

ANEXO 1 - Aprovação no Comitê de Biossegurança da FCF/USP



ANEXO 2 - Certificado de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCF/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Oficio CEUA/FCF/67/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Avaliação da imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas em antígenos de diferentes estágios do Plasmodium vivax expressos em Pichia pastoris" (Protocolo CEUA/FCF/362), de responsabilidade da pesquisadora Luciana Chagas de Lima, sob a orientação da Profa. Dra. Irene da Silva Soares, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 02 de julho de 2012.

São Paulo, 06 de agosto de 2012.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 680 - Bloco 13 A - Cldade Universitària - CEP 06508-900 - São Paulo - SP Fone: (11) 3091-3422 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuatof@usp.br

ANEXO 3 - Aprovação de alterações do projeto no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCF/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Oficio CEUA/FCF/118/2012

São Paulo, 06 de novembro de 2012.

Ilmo(a) Sr(a). Luciana Chagas de Lima Profa. Dra. Irene da Silva Soares FBC

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP, em reunião realizada em 05 de novembro de 2012, **aprovou** as alterações do projeto "Avaliação da imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas em antígenos de diferentes estágios do Plasmodium vivax expressos em Pichia pastoris" para (Protocolo CEUA nº 362), no que consiste na solicitação de 336 camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Juilson de Oliveira Martins Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

CEUA/FCF/USP