

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

Imunizações pré-clínicas contra malária utilizando uma  
proteína recombinante baseada no domínio II do antígeno 1  
de membrana apical de *Plasmodium vivax*

Fernanda Gentil Omori

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientadora:  
Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo  
2010

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

Imunizações pré-clínicas contra malária utilizando uma  
proteína recombinante baseada no domínio II do antígeno 1  
de membrana apical de *Plasmodium vivax*

Fernanda Gentil Omori

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientadora:  
Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo  
2010

Fernanda Gentil Omori

Imunizações pré-clínicas contra malária utilizando uma proteína recombinante baseada no domínio II do antígeno 1 de membrana apical de *Plasmodium vivax*

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Profa. Dra. Irene da Silva Soares  
Orientadora/ presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

São Paulo, de janeiro de 2010.

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

“Todos estes que aí estão atravancando o  
meu caminho, eles passarão.

Eu passarinho!”

**Mário Quintana”**

**Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, que sempre permaneceram ao meu lado, me dando acima de tudo muito amor e carinho. Meus pais, minha irmã, meu marido e principalmente minha filha Giovanna.**

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Profa. Dra. Irene Soares pela oportunidade, pelos inúmeros ensinamentos, pelos desabafos, apoios, amizade, companhia, dedicação, paciência, conselhos, enfim, por ser a base da minha carreira científica;

A coorientação do Prof. Maurício Rodrigues, por discutir resultados e hipóteses, além de permitir a utilização de seu laboratório e o auxílio de seus alunos,

Ao Dr. Daniel Bargieri, por ser meu braço direito nesse trabalho, me orientando em experimentos, me ensinando ciência, além de permitir horas agradáveis durante os trabalhos desenvolvidos;

A aluna de iniciação científica Mariana Patrício, pelo início deste projeto, por me ensinar a manusear camundongos e por me proporcionar inúmeros momentos felizes e de descontração;

Ao Prof. Fábio Costa e sua aluna Juliana Leite pela colaboração nos ensaios de imunofluorescência;

A Profa. Clarissa Palatnik de Souza pelo fornecimento de adjuvantes;

Ao Prof. Sandro e a Profa. Karen pelo auxílio nos experimentos de cultura celular e também pela amizade;

Ao Prof. Marcelo Urbano e ao Prof. Gerhard Wunderlich, pelas dicas no Laveran e na qualificação;

Ao seminário Laveran & Deane, principalmente aos professores Cláudio Ribeiro e Maria de Fátima pelos aprendizados, pela oportunidade, pelos momentos felizes tanto discutindo sobre malária quanto passeando de barco por praias maravilhosas;

Aos alunos que passaram pelo laboratório, Carol, Mayara, Wesley, Bruno, Lu, Carlinha, Tati, Elaine, Cris e Jaque pelos ensinamentos e acima de tudo pela amizade e companhia, todos vocês possuem um espaço no meu coração e serão para sempre inesquecíveis;

Aos alunos que estão presentes no laboratório, Nani, Katita, Vic, Mendis, Déia, Mayne e Paula, eu não tenho nem palavras para dizer o quanto vocês são importantes para mim, o quanto me fazem bem, me fazem sorrir, me acalmam, me ensinam, enfim, só tenho que agradecer;

Às meninas: Soninha, Vanessa, Karla, Glorinha, Karen (novamente), Silene, Gi, Dani e Rô, pela amizade, companhia, risadas, fofocas...;

Àos funcionários Ana, Dora, Edna, Sueli, Elaine, Jorge, Rê, Dorlei, Carmen, Cláudia, Rose e Maurício pela amizade e auxílio de diferentes gêneros,

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

Aos meus sogros Wilma e Nelson, e seus familiares, pelo auxílio, amizade e compreensão;

Aos meus bons e velhos amigos da vida, Babi, Rê, Vani, Baj, Dani, João, Mari, Ju, Gi, pela poderosa amizade, realmente não tenho nem como agradecer a amizade de vocês;

Aos meus amigos da faculdade, Gui, Dani, Mari, Renan, Martinha, Thaís pela amizade e pelos diversos momentos felizes;

A minha amiga de infância do Laveran, Bruninha grande presente que a vida me deu, muito obrigada pela sua amizade, companhia, dedicação e a hospitalidade tanto sua quanto do seu maridão Bruno;

A minha irmã mais velha, alma gêmea feminina, Bianca e seu grande marido Iuri, pela amizade, companhia, fidelidade, compreensão, confiança, enfim, o destino nos uniu;

A amiga gaucha Angélica e seu marido Yuri, pela amizade, companhia e dedicação, nunca vou esquecer o que fizeram por mim;

Aos meus familiares queridos, Tio João, Tia Má, primo irmão Nick, Tia Célia, Tio Celso, Tio Toninho, primos irmãos Vicente e Leonardo, Tia Iza, Vozinho Gelim, e os vizinhos presentes no meu coração, vizinha Ditinha, vizinho Lucio e vizinha Ciloca;



Ao meu cunhado e compadre Rê, pela amizade, companhia, alegria;

Aos meus pais, indiscutivelmente os melhores pais do mundo, e a minha irmã única, Dé, por tudo o que sou hoje, por me formarem intelectualmente, pela minha personalidade, pelo meu caráter, por tudo, dizer que amo vocês é muito pouco perto do vocês são para mim, vocês são a minha vida;

Ao meu marido Ale, minha alma gêmea, meu porto-seguro, minha calma, minha felicidade, meu amor, meu alicerce, meu tudo, te amo muito;

E finalmente ao meu presente enviado por Deus, minha filha Giovanna, filha mais querida, mais amada, a mamãe luta cada vez mais exclusivamente por você, você é parte de mim, agradeço todos os dias por tê-la em minha vida, eu sou uma pessoa realizada.

## Resumo

Gentil, F. Imunizações pré-clínicas contra malária utilizando uma proteína recombinante baseada no domínio II do antígeno 1 de membrana apical de *Plasmodium vivax* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2009.

O Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) tem sido sugerido como candidato a compor uma vacina contra estágios assexuados sanguíneos de *Plasmodium*. Recentemente nosso grupo identificou o domínio II (DII) de AMA-1 de *Plasmodium vivax* (PvAMA-1) como uma região altamente reconhecida por anticorpos IgG de indivíduos brasileiros infectados por *P. vivax*. No presente estudo avaliamos as propriedades imunogênicas da proteína recombinante DII, produzida a partir de *Escherichia coli*. Grupos de 6 camundongos fêmeas BALB/c foram imunizados quatro vezes com 10 µg dessa proteína na presença de diferentes formulações de adjuvantes [Adjuvante Completo/Incompleto de Freund (ACF/AIF), MPL-TDM, TiterMax, Hidróxido de Alumínio (Alum), Quil A, QS-21 e CpG-ODN 1826], individualmente, ou em combinação (Alum + QS-21 ou Alum + CpG-ODN 1826)). Nosso objetivo foi avaliar comparativamente a resposta de anticorpos (IgM, IgG e isotipos de IgG), induzida pelos diferentes esquemas de imunizações, visando futuros estudos pré-clínicos em primatas não humanos. Os títulos de anticorpos IgG contra (o ectodomínio) PvAMA-1 foram determinados por ELISA, duas semanas após cada imunização. A presença de IgM e dos isotipos de IgG também foi avaliada após o final do esquema de imunizações. Nossos resultados demonstraram que a proteína recombinante DII foi altamente imunogênica em camundongos BALB/c quando administrada na presença dos adjuvantes testados. Altos títulos de IgG1, IgG2a e IgG2b foram observados na maioria dos grupos (com exceção do adjuvante Alum), sugerindo uma resposta mista Th1/Th2. Finalmente, demonstramos que anticorpos monoclonais e policlonais anti-DII reconheceram a proteína nativa expressa na superfície de merozoítas de *P. vivax*, por imunofluorescência. Em conclusão, nossos resultados mostraram que a proteína recombinante o domínio II de PvAMA-1 (DII) foi imunogênico em camundongos BALB/c quando administrado na presença das diferentes

formulações de adjuvantes testadas, sugerindo que esse antígeno possa ser utilizado como uma vacina de subunidade contra a malária *vivax*.

**Palavras-chave:** *Plasmodium vivax*. AMA-1. Vacina recombinante.

## ABSTRACT

GENTIL, F. Pre-clinical immunizations against malaria using a recombinant protein based on domain II of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1. 2009. 96 p. Master thesis (Clinical and toxicological analyses) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1) has been considered a malaria vaccine candidate against asexual blood stages of *Plasmodium*. Recently, we identified the domain II (DII) of *Plasmodium vivax* AMA-1 (PvAMA-1) as a region highly recognized by IgG antibodies from Brazilian individuals infected by *P. vivax*. In the present study, we evaluated the immunogenic properties of a bacterial recombinant PvAMA-1 DII. Groups of 6 female BALB/c were immunized four times with 10 µg of recombinant protein in the presence of different adjuvant formulations [Complete/Incomplete Freund's Adjuvant (CFA/IFA), MPL-TDM, TiterMax, Aluminum hydroxide (Alum), Quil A, QS-21, CpG-ODN 1826] separately or in combination (Alum + QS-21 or Alum + CpG-ODN 1826). Our goal was to compare the antibody response (IgM, IgG and IgG subclass) induced by different protocols of immunization aiming at future pre-clinical studies in non-human primates. The IgG antibody titers against PvAMA-1 were determined by ELISA two weeks after each immunizing dose. The presence of IgM and IgG subclass were evaluated after the end of immunizations schedule. We found that the recombinant DII was highly immunogenic in BALB/c mice when administered in the presence of all adjuvant tested. High titers of IgG1, IgG2a and IgG2b were observed in all groups (except for Alum adjuvant), suggesting a mixed Th1/Th2 response. Finally, we demonstrated that monoclonal and polyclonal antibodies against DII recognized the native protein expressed on the *P. vivax* merozoite surface parasites by immunofluorescence. Together, our data demonstrated that the recombinant PvAMA-1(DII) was immunogenic in mice when administered in different adjuvant formulations, suggesting that this protein can be used as part of a sub-unit vaccine against malaria *vivax*.

**Key words:** *Plasmodium vivax*. AMA-1. Recombinant vaccine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico do <i>Plasmodium sp.</i> .....	6
Figura 2. Representação esquemática da estrutura da proteína AMA-1 de <i>Plasmodium sp.</i> .....	11
Figura 3. Ilustração da estrutura tridimensional de PvAMA-1.....	11
Figura 4. Análise em SDS-PAGE das proteínas recombinantes baseadas em PvAMA-1.....	37
Figura 5. Análise comparativa dos títulos de anticorpos IgG após imunizações em camundongos BALB/c com as proteínas baseadas em PvAMA-1.....	39
Figura 6. Comparação da resposta de anticorpos IgG após imunizações de camundongos BALB/c com DII na presença dos adjuvantes ACF/AIF, Alum e Quil A.....	40
Figura 7. Comparação da resposta de anticorpos IgG após imunizações de camundongos BALB/c com DII na presença dos adjuvantes ACF/AIF, MPL-TDM e TiterMax Gold.....	41
Figura 8. Comparação da resposta de anticorpos IgG após imunizações de camundongos BALB/c com DII na presença dos adjuvantes ACF/AIF, QS-21 e CpG-ODN 1826.....	42
Figura 9. Magnitude da resposta de anticorpos IgG após imunizações de camundongos BALB/c com DII na presença dos adjuvantes ACF/AIF, Alum, Quil A, QS-21, CpG-ODN 1826 e TiterMax Gold.....	44
Figura 10. Efeito comparativo da administração da proteína DII em camundongos BALB/c, na presença de combinações de adjuvantes.....	45
Figura 11. Avaliação da resposta de anticorpos IgM e isotipos de IgG anti-PvAMA-1 nos soros de camundongos imunizados com DII na presença dos diferentes adjuvantes testados.....	46
Figura 12: Análise por immunoblotting da proteína recombinante PvAMA-1 (DII) em condições não redutoras (NR) e redutoras(R).....	48
Figura 13: Análise da reatividade de anticorpos monoclonais anti-DII.....	49
Figura 14: Análise do reconhecimento da proteína nativa expressa na superfície de merozoítas de <i>P. vivax</i> por anticorpos anti-DII.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sumário das pesquisas com antígenos de <i>P. vivax</i> candidatos à vacina .....	9
Tabela 2. Resposta imune acionada por imunoestimuladores.....	18
Tabela 3. Resposta imune acionada por veículos ou sistemas de entrega.....	19

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologia da malária.....	2
1.2 Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> , características gerais.....	3
1.3 Avanços no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra malária <i>vivax</i> ...	6
1.4 Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1).....	10
1.4.1 Estrutura, função e polimorfismo.....	10
1.4.2 AMA-1 e a resposta humoral contra malária.....	13
1.4.3 AMA-1 e a resposta celular contra malária.....	17
1.5 Adjuvantes.....	17
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1 Composição das soluções, tampões e meios de cultura utilizados.....	25
3.1.1 Soluções e tampões para eletroforese de proteína (SDS-PAGE).....	25
3.1.2 Meios para cultura de bactérias.....	25
3.1.3 Tampões utilizados para obtenção da proteína PvAMA-1 (DII) a partir do sobrenadante dos extratos bacterianos.....	26
3.1.4 Tampões utilizados para obtenção da proteína PvAMA-1 (E) a partir dos precipitados dos extratos bacterianos (corpos de inclusão).....	27
3.1.5 Soluções e tampões para ensaios imunoenzimáticos (ELISA).....	28
3.1.6 Soluções e tampões para “immunoblotting”.....	28
3.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	29
3.2.1 Expressão e purificação da proteína recombinante baseada no domínio II de PvAMA-1(DII).....	29
3.2.2 Expressão e purificação da proteína recombinante baseada no ectodomínio inteiro de PvAMA-1 (E).....	29

3.3 Adjuvantes.....	31
3.3.1 Imunizações experimentais.....	31
3.4 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA).....	32
3.4.1 Detecção de anticorpos IgM, IgG e isotipos de IgG anti-PvAMA-1 em camundongos imunizados.....	32
3.4.2 Caracterização da reatividade de anticorpos monoclonais contra DII.....	33
3.5 Reação de imunofluorescência.....	34
3.6 Análise estatística.....	35
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
4.1 Obtenção das proteínas recombinantes.....	37
4.2 Imunizações pré-clínicas com proteínas recombinantes baseadas em PvAMA-1 (DII e E).....	37
4.3 Imunizações pré-clínicas com a proteína DII na presença de diferentes adjuvantes.....	40
4.4 Caracterização da reatividade de anticorpos monoclonais anti-domínio II de PvAMA-1.....	47
4.5 Reconhecimento da proteína nativa expressa em merozoítas de <i>P. vivax</i> por anticorpos anti-PvAMA-1 DII (policlonais e monoclonais).....	50
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>81</b>



## ***I. INTRODUÇÃO***

---

## 1.1 Epidemiologia da malária

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008), aproximadamente 40% da população mundial, vive em áreas de risco de transmissão de malária. A malária é a principal parasitose tropical, causando a morte de 1 a 2 milhões de pessoas anualmente, sendo que cerca de 500 milhões de pessoas são infectadas todos os anos. A alta mortalidade ocorre principalmente em crianças com menos de 5 anos de idade infectadas pelo *Plasmodium falciparum*. A maioria dos casos e mortes ocorre na África sub Saariana, no entanto, a Ásia, América Latina e a Europa são também afetadas (OMS, 2008).

Das espécies de *Plasmodium* que infectam comumente o homem (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*), o *P. falciparum* é o responsável pela maioria das doenças graves e mortes atribuídas a malária e é o mais prevalente na África, na região sul do Saara, e em certas áreas do Sudoeste da África e do Pacífico Ocidental. A segunda espécie de *Plasmodium* mais comum é o *P. vivax*, que é encontrado no sul e sudeste da Ásia, nas Américas Central e do Sul, alguns países da Europa e Norte da África (OMS – WORLD MALARIA REPORT, 2005). No Sul e Sudeste Asiático, a infecção por *P. vivax* provavelmente representa mais de 80% dos casos de malária e nas Américas Central e do Sul mais de 70% (revisto por MUELLER et al., 2009). Nas Américas, o *P. vivax* está presente em 20 países. A maioria dos casos de malária *vivax* da América do Sul ocorre na Colômbia e Brasil (HIGGS; SINA, 2005).

Segundo Price, et al, (2007), a malária *vivax* vem sendo subestimada. Apesar de ser considerada uma doença benigna e de infecção controlável, quando consideramos a densidade da população de áreas endêmicas, o número de pessoas com risco de infecção por *P. vivax* atinge 2,6 bilhões de pessoas, valor ligeiramente maior ao número de pessoas com risco de infecção por *P. falciparum* (GUERRA; SNOW; HAY, 2006). Além disso, estudos mostram que cerca de 130-145 milhões de infecções por *P. vivax* ocorrem ao ano e que, assim como as infecções pelo *P. falciparum*, podem frequentemente causar graves e complicados sintomas clínicos levando a morte (revisto por BAIRD, 2007; revisto por GALINSKI; BARNWELL, 2008).

No Brasil, mais de 99% dos casos de malária ocorrem na região da Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins). Em 2008, foram totalizados 306.347 mil casos de malária no Brasil, sendo a região da Amazônia Legal responsável por 305.639 mil casos. A transmissão da malária no Brasil ocorre por três espécies de *Plasmodium*: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, onde o maior responsável é o *P. vivax* que no ano de 2007 acometeu 79,6% de todos os casos notificados (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Fatores como instabilidade de políticas de saúde, alterações climáticas locais e globais e, biológicas, como o surgimento de cepas de parasitas e mosquitos refratários a drogas, têm contribuído para o elevado número de casos de malária na maioria maior parte dos países atingidos (revisto por SIBLEY; RINGWALD, 2006). Neste contexto, é indispensável maior empenho para praticar novas medidas de controle e informação a respeito da doença. Desta forma, é imprescindível o desenvolvimento de estratégias adicionais, como vacinas, drogas e inseticidas efetivos.

## **1.2 Ciclo de vida do *Plasmodium*, características gerais**

O ciclo de vida do *Plasmodium* (Figura 1) inicia-se quando a fêmea do gênero *Anopheles* ao fazer o repasto sanguíneo em um hospedeiro humano ingere as formas sexuadas do parasita (gametócitos). No interior de seu estômago com a fecundação e formação de um ovo ou zigoto ocorre a maturação originando o oocineto que migra para a hemolinfa do mosquito, se diferenciando em oocisto onde são formados, por esporogonia, centenas de esporozoítas. Após o amadurecimento dos oocistos, os esporozoítas são liberados e migram para as glândulas salivares do inseto, as quais poderão, no momento da picada, serem inoculadas no ser humano. Ao picar um mamífero, os mosquitos, de um modo geral, injetam uma pequena quantidade de saliva que contém vasodilatadores e anticoagulantes. Juntamente com essa saliva, os esporozoítas, formas infectantes, são inoculados. Os esporozoítas são injetados na pele e não diretamente na circulação sanguínea como se acreditava até recentemente. Posteriormente eles realizam movimentos

randômicos e de padrão tortuoso pela derme até atingirem o sistema circulatório, o que os permitem alcançar o fígado. Durante a migração na pele, o parasita pode estar vulnerável a anticorpos contra proteínas de superfície do *Plasmodium*, o qual pode funcionar como a primeira linha de resposta imune adquirida do hospedeiro contra o parasita. Recentes observações em microscopia intravital mostraram que uma proporção significativa de esporozoítas injetados pelos mosquitos permanece na derme após o fim do deslizamento do parasita. Daqueles que deixam a área da picada aproximadamente 70% entram nas veias sanguíneas e os 30% restantes invadem veias linfáticas. A maioria dos que entraram nas veias linfáticas não alcançam o sistema circulatório, no entanto eles são presos nos linfonôdos onde a maioria é fagocitada por células dendríticas (AMINO et al., 2006).

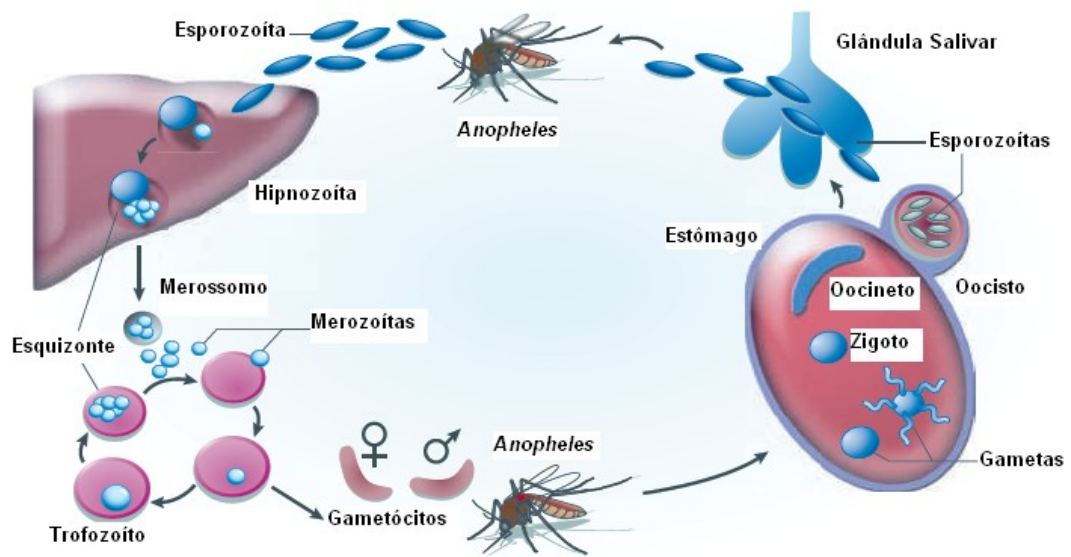
Passa-se um breve período em que os esporozoítas circulam livres pelo sangue. Neste curto período alguns deles são fagocitados, porém, vários deles podem alcançar o fígado e, no interior das células hepáticas, os plasmódios passam por uma primeira divisão assexuada (esquizogonia tecidual). Um passo obrigatório durante a infecção é o estabelecimento e o completo desenvolvimento dos esporozoítas dentro dos hepatócitos, o qual, embora não sintomático, da origem a milhares de esporozoítas em cada hepatócito. Similar a diversos estágios de invasão de outros parasitas do filo Apicomplexa, esporozoítas de *Plasmodium* possuem duas características interconectadas que são cruciais para completar o seu ciclo de vida: deslizamento (“gliding motility”) (STEWART; VANDERBERG, 1988) e a capacidade de migrar através das células hospedeiras (MOTA; RODRIGUEZ, 2001). A infecção de células hospedeiras por esporozoítas de *Plasmodium* requer motilidade dos esporozoítas e presumivelmente a invaginação de membrana plasmática formando o vacúolo parasitóforo (MEIS et al., 1983). Esporozoítas também podem entrar e sair das células hospedeiras, “atravessando” a membrana plasmática, um processo que requer deslizamento, utilizado para migrar por células hospedeiras e tecidos (MOTA; RODRIGUEZ, 2001).

Das espécies capazes de infectar o ser humano, duas, *P. vivax* e *P. ovale*, apresentam uma forma dormente do parasita no fígado, os hipnozoítas. Estas formas podem permanecer em estado de latência por períodos que

variam de 1 mês a 1-2 anos. Nestes casos, que recebem a denominação de recaídas, a pessoa infectada volta a apresentar a doença por uma ou mais vezes após o tratamento inicial, mesmo que não tenha freqüentado áreas com transmissão, devido à reativação dos hipnozoítas. Os mecanismos envolvidos no desencadeamento desta reativação ainda não foram esclarecidos.

Após invadir os hepatócitos, os esporozoítas se diferenciam em trofozoítas pré-eritrocíticos que se multiplicam por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais e posteriormente a milhares de merozoítas que invadirão os eritrócitos. O desenvolvimento nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para *P. falciparum* e *P. vivax* e cerca de duas semanas para o *P. malariae*. Decorridos alguns dias, tendo sido produzidos alguns milhares de novos parasitas, a célula do fígado se rompe e os plasmódios, agora na forma de merozoítas, têm acesso ao sangue onde invadem os glóbulos vermelhos. Em algumas espécies que infectam roedores, *P. berghei* e *P. yoelli*, ocorre a ruptura do vacúolo parasitóforo ainda dentro dos hepatócitos, posteriormente ocorre a formação de merossomos, repletos de merozoítas, involtos por uma membrana originada das células do hospedeiro (STURM et al., 2006; TARUN et al., 2006).

Posteriormente a invasão dos eritrócitos, os merozoítas se transformam em trofozoítas jovens e posteriormente em trofozoítas maduros. O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasita se dá por esquizogonia, com conseqüente formação de esquizontes dando origem aos merozoítas que invadirão novos eritrócitos após ruptura das células. É importante ressaltar que, ao contrário do *P. falciparum*, que invade eritrócitos em todas as fases, o *P. vivax* infecta e se multiplica exclusivamente em eritrócitos jovens (reticulócitos). Além disso, indivíduos que não possuem o antígeno Duffy em suas hemácias são altamente resistentes à infecção por *P. vivax*. Novamente, se multiplicam de forma assexuada (esquizogonia eritrocítica), em ciclos variáveis (de 24 a 72 horas), cada parasita produzindo de 8 a 32 novos exemplares, em média e de acordo com a espécie envolvida. Depois de alguns ciclos, surgem os sintomas da doença. Este intervalo que vai desde a picada infectante até o início dos sintomas é chamado de período de incubação e dura cerca de 15 dias.



**Figura 1: Ciclo biológico do *Plasmodium sp*** (figura adaptada de PAIN; HERTZ-FOWLER, 2009).

### 1.3 Avanços no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra malária *vivax*

Diversos fatores fundamentais têm dificultado o avanço da pesquisa em malária *vivax*. As linhas gerais realizadas na percepção da malária *vivax* como uma infecção benigna, diminuíram sua posição no que diz respeito às prioridades de investigação, e, a incapacidade de manter o *P. vivax* em cultura contínua, *in vitro*, tem dificultado a investigação em laboratório o que demanda mais investimentos e grandes esforços em áreas endêmicas (revisto por BAIRD, 2007).

Segundo Kristoff (2007), a falha de métodos de controle do vetor (para atingir reduções adequadas de morbidade, mortalidade e a disseminação de resistência a drogas antimaláricas convencionais), tem levado o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra malária uma prioridade global. Uma vacina ideal poderia recapitular imunidade naturalmente adquirida em um cenário endêmico. No entanto, o progresso rumo a uma vacina eficaz tem sido lento, devido ao alto polimorfismo de antígenos-alvos e a incapacidade da

maioria das vacinas para levar a uma longa memória imunológica no hospedeiro.

Para melhor compreensão sobre a imunidade na malária, ensaios utilizando a tecnologia do DNA recombinante de *Plasmodium*, permitiram a obtenção de diversas proteínas recombinantes correspondentes, as quais estão sendo utilizadas em estudos imuno-epidemiológicos e imunizações experimentais, visando uma melhor compreensão da resposta imune e o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax* (revisto por ARÉVALO-HERRERA; HERRERA, 2001; revisto por HERRERA; CORRADIN; AREVALO-HERRERA, 2007). Além disso, com a finalização do projeto genoma de *P. vivax* (CARLTON et al., 2008), permitirá avanços na área proteômica visando à caracterização de novos antígenos e o estudo de suas funções biológicas.

Atualmente, mais de 70 formulações, de vacina para *P. falciparum* estão disponíveis, e, 23 destes encontram-se em fase clínica (revisto por REED et al., 2009). Ao contrário, apenas 2 candidatas a uma vacina contra *P. vivax* têm sido testadas em humanos e um modesto número de candidatas a uma vacina estão em testes pré-clínicos (OMS, 2005). Na maioria das áreas endêmicas as duas espécies coexistem (*P. falciparum* e *P. vivax*), por isso, é incompreensível tanto investimento para *P. falciparum* e atrasos na identificação e desenvolvimento de subunidades de *P. vivax*, uma vez que, ambas espécies teriam de apresentar antígenos alvos em uma vacina funcional (HERRERA; CORRADIN; AREVALO-HERRERA, 2007). O desenvolvimento de uma vacina contra *P. vivax* tem sido um grande desafio, devido aos limitados financiamentos para pesquisa e dificuldades técnicas, como um eficiente e contínuo sistema de cultura do parasita *in vitro*, entretanto, progressos importantes têm sido alcançados na identificação e caracterização de diferentes antígenos de *P. vivax* (HERRERA; CORRADIN; AREVALO-HERRERA, 2007). Na tabela 1 os mais importantes antígenos, candidatos a comporem uma vacina, estão apresentados.

**Tabela 1: Sumário das pesquisas com antígenos de *P. vivax* candidatos à vacina** (figura retirada da revisão de HERRERA; CORRADIN; AREVALO-HERRERA, 2007).

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

CSP = Circumsporozoite Protein; DBP = Duffy Binding Protein; LSP = Long Synthetic Peptides; SSP2/TRAP = Sporozoite Surface Protein 2/Thrombospondin Related Adhesive Protein; AMA-1 = Apical Membrane Antigen 1; Rec = Recombinant protein; MSP-1 = Merozoite Surface Protein 1; Pvs25 = *P. vivax* Surface Protein 25; MSP-9 = Merozoite Surface Protein 9; Pvs28= *P. vivax* Surface Protein 28.

Uma vacina pré-eritrocítica poderia impedir a entrada dos esporozoítas nos hepatócitos e, conseqüentemente, inibir o seu desenvolvimento em esquizontes. Embora múltiplos antígenos de *P. falciparum*, candidatos a comporem uma vacina, estejam em testes, apenas dois antígenos de esporozoítas foram identificados, CSP e SSP2/TRAP (HERRERA; CORRADIN; AREVALO-HERRERA, 2007). A CSP de *P. vivax*, similar a de *P. falciparum*, é a proteína do esporozoíta mais estudada, formada por um domínio central repetitivo imunodominante que possui três variantes (VK210, VK247 e *P. vivax*-like). No ano de 2005, um estudo de Fase Clínica 1 foi realizado na Colômbia, onde indivíduos sem histórico para malária foram imunizados com três antígenos LSPs, individualmente, baseados nas regiões N-terminal, C-terminal e ao Peptídeo R (este combina a região repetitiva da CSP com um epítopo



derivado do toxóide tetânico) da CSP de *P. vivax* (HERRERA et al., 2005). Na presença de Montanide ISA-720, as formulações foram bem toleradas e não ocasionaram efeitos adversos sérios. Ao final do estudo, os pesquisadores observaram que os peptídeos N e R induziram uma alta resposta humoral para todas as doses testadas (10 µg, 30 µg e 100 µg) diferentemente do peptídeo C-terminal (somente nas doses de 30 µg e 100 µg) (HERRERA et al., 2005). Anticorpos contra as três proteínas foram capazes de reconhecer esporozoítas por imunofluorescência, e, células mononucleares do sangue periférico, da maioria dos voluntários imunizados, produziram IFN- $\gamma$  quando estimulados pelo peptídeo *in vitro* (HERRERA et al., 2005).

Nos últimos anos, uma vacina baseada na região repetitiva do antígeno de CSP de *P. falciparum* fusionada a um antígeno (S) do vírus da hepatite B (RTS,S), na presença do adjuvante AS02 (QS-21 + MPL), tem sido considerada uma forte candidata a uma vacina pré-eritrocítica contra malária. Em estudos clínicos de Fase 2b, em Moçambique, essa vacina foi capaz de induzir níveis satisfatórios de proteção (30 – 50%), além de induzir uma forte resposta por anticorpos e estimular linfócitos do tipo Th1, os quais participam na resposta imune mediada por células (revisto por ALONSO, 2006). Existe expectativa que essa vacina seja licenciada até 2011 (MAHER et al., 2008).

O início da fase eritrocítica é uma etapa bastante crítica no ciclo biológico do parasita e as proteínas que participam deste evento são importantes candidatas para o desenvolvimento de uma vacina. Entre as proteínas de merozoítas que tem sua função biológica ligada à invasão dos eritrócitos/reticulócitos estão: Proteína 1 da Superfície do Merozoíta (MSP-1) e Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1). Diversos trabalhos sobre a imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas na MSP-1 e AMA-1 de *P. vivax* (PvMSP-1 e PvAMA-1 respectivamente), utilizando camundongos e macacos, vêm sendo realizados. Nessa linha de pesquisa, o nosso grupo tem dado importantes contribuições visando o desenvolvimento de uma vacina de subunidades contra o *P. vivax*. Em diferentes trabalhos nosso grupo pode observar que após imunizações na presença de adjuvantes fortes, alta imunogenicidade da região C-terminal da MSP-1 de *P. vivax*, é sempre observada (CUNHA; RODRIGUES; SOARES, 2001; SOARES; RODRIGUES,

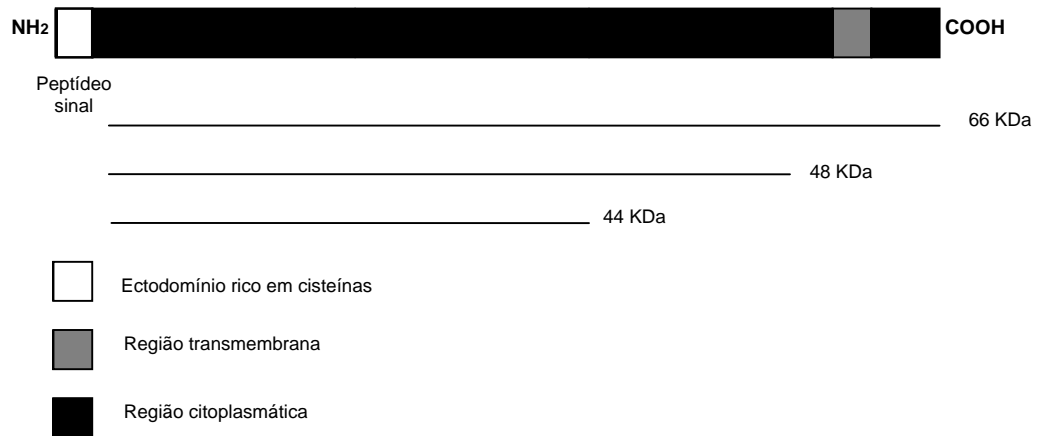
2002; ROSA et al., 2004; 2006; BARGIERI et al., 2007; 2008). Recentemente evidenciamos a imunogenicidade de PvAMA-1 em camundongos, os quais produziram altos títulos de anticorpos IgG1, IgG2a e IgG2b após imunizações com essa proteína expressa a partir de *Escherichia coli* (MÚFALO et al., 2008).

Devido à complexidade do ciclo biológico do *Plasmodium*, é pouco provável que uma vacina eficaz contra a malária seja baseada em um único antígeno do parasita. Por isso, acredita-se que uma vacina com combinações de antígenos alvos e diferentes alelos proporcionaria uma vacina efetiva contra malária.

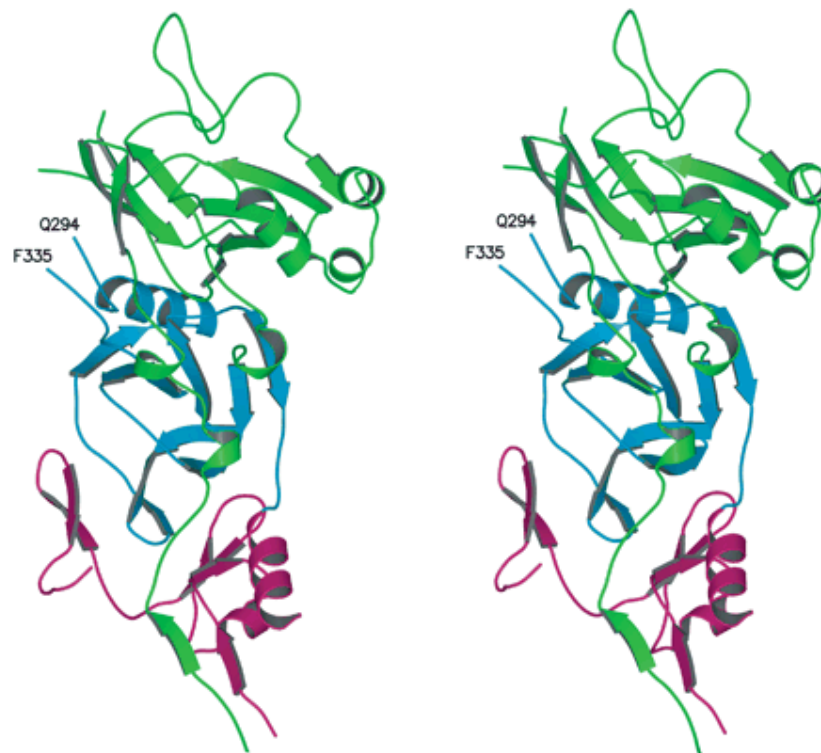
## **1.4 Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1)**

### **1.4.1 Estrutura, função e polimorfismo**

AMA-1 é uma proteína presente nos micronemas dos parasitas do filo Apicomplexa e parece ser essencial para a invasão de eritrócitos. Estruturalmente conservada, é uma proteína do tipo I (WATERS et al., 1990), variando de 556 a 563 aminoácidos, presente em todas as espécies de *Plasmodium* (622 aa em *Plasmodium falciparum* e no *P. reichenowi* responsável pela malária de chimpanzé CHESNE-SECK et al., 2005). Esta proteína é composta por um peptídeo sinal, um ectodomínio que pode ser subdividido em domínios, uma região transmembrana e uma região citoplasmática, esquematizada na figura 2 (revisto por REMARQUE et al., 2008). Em 2005, Pizarro e colaboradores elucidaram a estrutura tridimensional de PvAMA-1 recombinante (Figura 3), expressa em *Pichia pastoris*, comprovando a presença de três domínios (DI, DII e DIII). A resolução desta estrutura confirmou o tipo de conformação inicialmente sugerido pela seqüência primária de aminoácidos da proteína, sendo constituída por três domínios que possuem 16 resíduos de cisteína que formam 8 ligações dissulfídicas, dos quais dois (I e II) formam módulos “PAN”, freqüentemente associados a interações proteína-proteína e proteína-carboidrato.



**Figura 2: Representação esquemática da estrutura da proteína AMA-1 de *Plasmodium sp.*** Proteína AMA-1 de *Plasmodium* destacando os fragmentos resultantes da clivagem proteolítica da proteína.



**Figura 3: Ilustração da estrutura tridimensional de PvAMA-1.** Representação da estrutura tridimensional obtida pela análise cristalográfica de uma proteína recombinante baseada no ectodomínio de AMA-1 de *P. vivax* expressa em *Pichia pastoris* (PIZARRO et al., 2005). As fitas em verde representam a estrutura do domínio I, em azul o domínio II e em vermelho o domínio III.

A proteína precursora de 83 KDa, presente nos micronemas é hidrolisada na região N-terminal anteriormente a invasão de eritrócitos, sendo então transportada para a superfície do merozoíta como uma proteína madura de 66 KDa (CREWETHER et al., 1990), a qual é novamente hidrolisada em três fragmentos, um fragmento de 48 KDa, formado pela maior parte do ectodomínio (HOWELL et al., 2001), um fragmento de 44 KDa com a quebra no domínio III (HOWELL et al., 2003), e um fragmento de 52 KDa resultante da ruptura da região intra membrana de AMA-1, como descrito para proteínas do micronema de *Toxoplasma gondii* (SILVIE et al., 2004).

Apesar da função de AMA-1 ainda não estar bem clara, diversos estudos sugerem que AMA-1 de *Plasmodium* sp tem como funções: (i) se ligar a eritrócitos (FRASER et al., 2001; KATO, 2005) e (ii) promover a reorientação dos merozoítas na superfície de células vermelhas do sangue (MITCHELL et al., 2004). Outras descobertas foram obtidas no parasita *Toxoplasma gondii*, pertencente também ao filo Apicomplexa, em que AMA-1 está envolvido na regulação da secreção da roptria mediante a formação do “moving junction”, uma área de íntimo contato entre o parasita e a célula hospedeira no momento de invasão (ALEXANDER et al., 2005; 2006; MITAL et al., 2005). Recentemente Treeck e colaboradores (2009) identificaram na região do domínio citoplasmático de PfAMA-1, resíduos essenciais para a função de invasão ao eritrócito, eles mostraram que a fosforilação dos mesmos é de extrema importância para o processo de invasão (TREECK et al., 2009).

Em 2007, foi mapeado o epítipo reconhecido pelo anticorpo monoclonal anti-PfAMA-1 4G2, o qual é capaz de inibir a invasão de *P. falciparum* (COLLINS et al., 2007), entretanto, essa inibição é impedida quando AMA-1 encontra-se complexada com as AAPs, do inglês *Additional Associated Proteins* (RON4, RON2 e Ts4705), proteínas homologas às presentes em *T. gondii*. Posteriormente, no mesmo trabalho, o grupo mostrou que um único resíduo conservado, Tyr251 de PfAMA-1, presente na região hidrofóbica adjacente ao epítipo de 4G2, é necessário para formação do complexo PfAMA-1-AAPs (COLLINS et al., 2009). Anteriormente, Feng e colaboradores, identificaram em 2005 que o epítipo 4G2 está localizado na base do “loop” do domínio II, o qual é bem conservado entre os ortólogos de *Plasmodium*,

contribuindo assim para futuros estudos de construção de vacinas de subunidades e também no sentido de ajudar a elucidar a função da proteína AMA-1.

Uma questão de extrema importância quando se pensa na produção de uma vacina, é a variabilidade genética do antígeno. Até o presente momento, existem poucos estudos de polimorfismo do gene *Pvama-1* inteiro, pois a maioria dos estudos tem focado o domínio I. A análise da diversidade de nucleotídeos de *Pvama-1* de isolados do Sri Lanka, revelou 20 sítios polimórficos no DI, 12 no DII e 2 no DIII. Entretanto, após análise da razão de substituições não sinônimas por substituições sinônimas, Gunasekera e colaboradores observaram uma razão significativamente mais alta para DII quando comparada a DI, sugerindo que o domínio II estaria possivelmente sob alta pressão seletiva (GUNASEKERA et al., 2007). Resultados semelhantes foram encontrados por Thakur e colaboradores (2008) analisando isolados de *P. vivax* da Índia. Por outro lado, estudos com *Pfama-1* têm sugerido forte seleção positiva sobre os domínios I e III da proteína (POLLEY; CONWAY, 2001; POLLEY; CHOKEJINDACHAI; CONWAY, 2003). Deste modo, diferentes regiões entre PvAMA-1 e PfAMA-1 podem estar sob diferentes pressões em termos de seleção imune e estrutural e/ou limitações funcionais, como tem sido proposto para PvTRAP e PfTRAP (PUTAPORNTIP et al., 2001).

#### **1.4.2 AMA-1 e a resposta humoral contra malária**

Anticorpos parecem ter um papel importante na proteção através de diversos mecanismos, como inibição da invasão do parasita, bloqueio dos parasitas intra-eritrocíticos e inibição mediada pelas células mononucleares. Além disso, os anticorpos podem neutralizar o efeito tóxico associado com a ruptura dos esquizontes que conduzem ao quadro sintomático (calafrio e febre) (revisto por KARUNAWEEERA et al., 2003).

Acredita-se que anticorpos protetores têm, principalmente, como alvo, os antígenos de superfície de merozoíta, ligantes da invasão eritrocitária e antígenos variantes expressos na superfície de eritrócitos infectados por *P. falciparum* (revisto por BEESON; OSIER; ENGWERDA, 2008). Embora a

correlação com proteção parece desconhecida, a primeira medida para o desenvolvimento de uma vacina com PfAMA-1 tem sido a sua capacidade de induzir anticorpos inibitórios de crescimento do parasita *in vitro* (revisto por REMARQUE et al., 2008). O homem e outras espécies imunizadas com um único alelo de AMA-1 produziram anticorpos capazes de inibir a invasão de eritrócitos *in vitro* (HODDER; CREWETHER; ANDERS, 2001; KOCKEN et al., 2002).

Estudos em modelos animais e *in vitro* demonstraram que anticorpos contra AMA-1 podem reduzir substancialmente a multiplicação do parasita e proteger contra infecções letais (revisto por REMARQUE et al., 2008). A prova mais direta de que os anticorpos são importantes mediadores da imunidade contra malária vem de estudos pioneiros de transferência passiva de anticorpos de indivíduos adultos, africanos, que tiveram malária *falciparum*, para pacientes tailandeses (que não responderam ao tratamento convencional). Tal procedimento foi capaz de diminuir os sintomas clínicos e a parasitemia, proporcionando sucesso no tratamento dos pacientes com malária grave (SABCHAREON et al., 1991; revisto por BEESON; OSIER; ENGWERDA, 2008).

O desenvolvimento de uma vacina baseada na proteína AMA-1 poderia ser eficiente contra infecções na fase pré-eritrocítica e sanguínea, uma vez que esta proteína está presente nos esporozoítas e merozoítas (SILVIE et al., 2004). Estudos iniciais demonstraram que anticorpos monoclonais (THOMAS et al., 1984) e policlonais (DEANS et al., 1988) contra AMA-1 de *P. knowlesi* foram capazes de inibir a invasão de eritrócitos por merozoítas *in vitro*. Estes resultados foram confirmados com anticorpos policlonais de coelhos específicos contra AMA-1 de *P. chabaudi*, os quais foram capazes de transferir passivamente imunidade contra a infecção em camundongos (CREWETHER et al., 1996).

Posteriormente, a imunização passiva com anticorpos monoclonais contra a proteína AMA-1 nativa de *P. yoelii* permitiu a sobrevivência de camundongos desafiados com o parasita (NARUM et al., 2000). Outras evidências que sugerem fortemente a importância dos anticorpos contra a AMA-1 na imunidade contra as formas sanguíneas de malária foram obtidas após

imunizações experimentais com proteínas recombinantes. A imunização de coelhos com proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 induziu a produção de anticorpos capazes de inibir a invasão do merozoíta de *P. falciparum in vitro* (HODDER; CREWETHER; ANDERS, 2001; DUTTA et al., 2002, 2005; KENNEDY et al., 2002; KOCKEN et al., 2002; LALITHA et al., 2004).

Posteriormente, a imunização de camundongos ou macacos com proteínas recombinantes derivadas de AMA-1 de *P. chabaudi* (ANDERS et al., 1998) ou *P. fragile* (COLLINS et al., 1994), respectivamente, foi capaz de induzir proteção significativa contra a infecção. Em macacos *Aotus vociferans* imunizados com PfAMA-1 recombinante, na presença do adjuvante completo de Freund, foi observada uma significativa proteção após desafio com dose letal de estágios sanguíneos de parasitas homólogos. A proteção induzida pela imunização foi considerada efetiva, pois foi capaz de manter a parasitemia baixa em relação ao grupo não imunizado (STOWERS et al., 2002).

Com base nestes resultados promissores, foram realizados estudos clínicos de Fase 1 utilizando uma formulação baseada nesta proteína emulsificada na presença do adjuvante Alhydrogel, o qual demonstrou que esta foi bem tolerada e capaz de induzir anticorpos do tipo IgG especificamente dirigidos contra PfAMA-1 em 92% dos indivíduos após três imunizações (MALKIN et al., 2005). Por outro lado, em um segundo teste clínico de Fase 1, utilizando PfAMA-1 em adjuvante Montanide ISA720, Saul e colaboradores (2005), observaram que somente 6 dos 29 indivíduos vacinados soroconverteram. Destes, somente 1 desenvolveu altos títulos de anticorpos. Os autores atribuíram os resultados desapontadores a uma possível perda na potência da formulação vacinal durante o curso do estudo e acreditam ser importante conduzir outros testes clínicos de vacinação utilizando PfAMA-1.

Estudos clínicos de Fase 1 com a proteína AMA-1-C1 (mistura dos ectodomínios de PfAMA-1 das cepas 3D7 e FVO) na presença de Alhydrogel, mostraram-se seguras e imunogênicas (MALKIN et al., 2005, DICKO et al., 2007) em adultos dos Estados Unidos que nunca foram expostos a malária e adultos semi imunes de Mali (Oeste da África). Com base nestes estudos, DICKO e colaboradores (2008) iniciaram um novo estudo utilizando a mesma vacina para imunização de crianças que vivem numa área endêmica de

Donéguebougou em Mali, onde a vacina foi bem tolerada e altamente imunogênica apesar dos altos títulos de anticorpos não persistirem ao longo do tempo.

Nos últimos 2 anos, estudos clínicos de Fase 1 foram concluídos, no WRAIR (do inglês *Walter Reed Army Institute Research*) e em Mali, os quais avaliaram a vacina FMP2.1, baseada na proteína recombinante AMA-1, produzida a partir de *E. coli*, formulada no adjuvante ASO2A. Ambos os estudos demonstraram que a vacina foi bem tolerada e imunogênica (POLHEMUS et al., 2007; THERA et al., 2008). Recentemente, Spring e colaboradores (2009), realizaram estudos de Fase 1/2a onde compararam formulações de PfAMA-1 (3D7) na presença dos adjuvantes ASO1B e ASO2A. Essas formulações, testadas em adultos não expostos a malária, foram seguras e imunogênicas. Após desafio através de picadas de mosquitos infectados por *P. falciparum* homólogos, todos os participantes apresentaram parasitemia, entretanto uma significativa redução de parasitemia foi observada no grupo que recebeu a imunização na presença do adjuvante ASO2A. Atualmente, estudos com esta vacina, na presença do adjuvante ASO2A, em crianças residentes em Mali, estão em andamento.

Anticorpos IgG protetores pertencem a um painel restrito de subclasses, especificamente IgG1 e IgG3, enquanto que anticorpos IgG4 são considerados não protetores (revisto por GARRAUD et al., 2003). Em humanos, isotipos IgG1 e IgG2 são mais comumente produzidos em resposta a um antígeno protéico do que IgG3 (revisto por GARRAUD et al., 2003). Interessantemente, dados concordantes têm sido produzidos em modelos murinos, apesar da infecção experimental por *Plasmodium* em murinos ser definitivamente diferente de infecção natural em humanos, já que solicita uma forte resposta imune mediada por células T, e, pela linhagem que favoreça a produção de anticorpos, principalmente das subclasses IgG2a e IgG3 (ROTMAN et al., 1998; CAVINATO et al., 2001). Em indivíduos de áreas hiperendêmicas para transmissão de *P. falciparum*, anticorpos protetores contra a maioria dos antígenos identificados parecem pertencer às subclasses IgG3 e aqueles diretamente relacionados a MSP1<sub>19</sub> são predominantemente pertencentes às subclasses IgG3 e IgG1 (revisto por GARRAUD et al., 2003).



### 1.4.3 AMA-1 e a resposta celular contra malária

Até o presente momento, poucos estudos têm avaliado o papel da resposta imune celular contra-AMA-1. Existem evidências que, tanto a resposta imune celular, quanto a humoral, estão envolvidas na imunidade contra malária, embora a importância relativa de cada, ainda seja incerta (revisado por BEESON et al., 2008). Sabe-se que o reconhecimento por linfócitos T CD4+ é essencial para resposta de anticorpos específicos contra o *Plasmodium* (GOOD et al., 2005). Assim, uma vacina capaz de ativar essas células poderia contribuir para a proteção contra a infecção (POMBO et al., 2002). Além disso, a produção de citocinas (ex. IFN- $\gamma$ ) induzidas por antígenos da fase sanguínea assexuada podem também contribuir para uma resposta imune protetora (HERRERA et al., 1992).

Epítomos imunodominantes para células T foram implicados na resposta imune humana protetora contra AMA-1 (AMANTE et al., 1997). Por outro lado, um estudo, utilizando camundongos deficientes de IFN- $\gamma$  e IL-4, mostrou que esta resposta não é crítica para a sobrevivência dos animais imunizados com AMA-1 recombinante e, posteriormente, desafiados com *P. chabaudi*. Outras populações de linfócitos como as células T $\gamma\delta$  também tem sido avaliadas quanto à sua participação na imunidade induzida pela imunização com PcAMA-1 (BURNS et al., 2004).

Portanto, pesquisas para definirem os mecanismos e alvos de imunidade, incluindo resposta humoral e celular, e como elas interagem, são cruciais para o desenvolvimento e avaliação de uma vacina, e, posteriormente, para a compreensão da patologia da doença (revisado por BEESON; OSIER; ENGWERDA, 2008).

## 1.5 Adjuvantes

Adjuvantes são moléculas, componentes ou macromoléculas complexas que aumentam a potência e a longevidade de uma resposta imune específica a um antígeno, mas podem causar uma toxicidade mínima e/ou efeitos imunes duradouros (WACK; RAPPUOLI, 2005). A adição de adjuvantes a vacinas aumenta, sustenta e direciona a imunogenicidade dos antígenos, efetivamente modulando uma resposta imune apropriada reduzindo a quantidade de antígeno ou o número de imunizações necessárias, gerando uma vacina efetiva em recém nascidos, idosos e indivíduos imuno-comprometidos (KENNEY; EDELMAN, 2003). Adjuvantes possuem uma eficácia dependente de uma apropriada formulação, contudo, ambos, componentes e formulação, do adjuvante (ex. óleo e água, tamanho de partícula, etc.), são cruciais para o aumento da potência de uma vacina (revisto por REED et al., 2009).

Os adjuvantes podem ser classificados em dois grupos:

1) Imunodominantes (Tabela 2): agem diretamente no sistema imune para aumentar a resposta aos antígenos. Incluem exemplos como: ligantes de TLR, citocinas, saponinas e exotoxina de bactérias que estimulam a resposta imune;

2) Veículos (Tabela 3): apresentam antígenos para o sistema imune, incluindo liberação controlada e sistema de entrega (“Depot Delivery Systems”), para aumentar a resposta imune específica a um determinado antígeno. Incluem como exemplo: sais minerais, emulsões, lipossomos, virossomos, microesferas de polímeros biodegradáveis e complexos imune-estimulantes (ex. ISCOM, ISCOMATRIX™) (revisto por REED et al., 2009).

Atualmente, o número de adjuvantes licenciados para uso no homem é limitado: i) sais minerais baseados em alumínio (Alum), ii) o MF59, iii) os virossomos, iv) MPL® (glicolípido), v) VLP e vi) toxina de cólera (revisto por REED et al., 2009). Entretanto, as demais vacinas, pediátricas ou não, cuja composição inclui vírus ou bactérias vivas ou atenuadas contêm algum tipo de “adjuvante natural” presente nestes microrganismos.

**Tabela 2: Resposta imune induzida por imunoestimuladores** (tabela adaptada da revisão de REED et al., 2009).

Imunoestimulantes	Interação celular	Tipo de resposta imune
ACF (micobactéria)	TLR-2	Th1, Ac* e NK
MPL-TDM (lipopolisacarídeo)	TLR-4	Th1 e Ac
CpG-ODN (DNA)	TLR-9	Th1, CTL, Ac e NK
Quil A (saponina)	Processamento de antígeno	Th1, CTL, Ac
QS-21 (saponina)	Processamento de antígeno	Th1, CTL, Ac

\* Ac (anticorpos)

**Tabela 3: Resposta imune induzida por veículos ou sistemas de entrega** (tabela adaptada da revisão de REED et al., 2009).

Veículo ou sistema de entrega	Resposta Th1	Resposta Th2	Resposta célula B	Persistência de resposta por célula T e B
Alum (sal mineral)	*	**	***	*
IFA (emulsão)	**	-	***	-

O adjuvante completo de Freund (ACF) possui micobactérias em sua fórmula, o que potencializa a imunogenicidade da vacina, porém este adjuvante não é licenciado para uso em humanos e está proibido a sua utilização em primatas não humanos, por isso se faz necessário a utilização de diferentes adjuvantes, uma vez que o nosso intuito também é a seleção de antígeno-adjuvante(s) para imunizações em primatas não humanos. De um modo geral, o ACF é amplamente utilizado para estudos que avaliam a imunogenicidade de antígenos no modelo murino. O adjuvante incompleto de Freund (AIF) também é uma emulsão água-em-óleo e difere do ACF por ser composto somente de óleo mineral e surfactante.

Atualmente o adjuvante mais frequentemente utilizado em vacinas humanas é o hidróxido de alumínio (Alum). Recentemente, MF59, uma variação do óleo biodegradável esqualeno, tem provado ser um potente

adjuvante com um recorde de segurança satisfatória e, portanto, apropriado para uso humano. Nos Estados Unidos, o único adjuvante atualmente aprovado para uso em seres humanos é o Alum. No entanto, na Inglaterra e em outros países da União Européia, o MF59 também pode ser utilizado (revisto por WILSON-WELDER et al., 2009).

O sistema adjuvante ASO2 (GlaxoSmithKline), que mescla uma emulsão de óleo e água com MPL e QS21, é produzido a partir de componentes que atuam sinergicamente para produzir anticorpos e melhorar a resposta de linfócitos Th1 e T citotóxicos contra uma proteína exógena. O QS-21 é uma fração purificada do Quil A que é produzido a partir da casca da árvore *Quillajara saponaria*. Esse sistema adjuvante, ASO2, é muito potente e utilizado em várias vacinas contra patógenos extremamente complexos, como *P. falciparum*, HIV e *Mycobacterium tuberculosis* (revisto por REED et al., 2009). A utilização de sistemas de adjuvantes (AS) tem sido amplamente combinada a vacina RTS,S na tentativa de induzir proteção contra as formas pré-eritrocíticas da malária.

Testes clínicos em crianças africanas residentes de Moçambique avaliaram a vacina RTS,S na presença do AS02A. Esta vacina se mostrou tolerável, segura e imunogênica (ALONSO et al., 2004; 2005). O plano de desenvolvimento para essa vacina tem como objetivo ser utilizada em crianças no seu primeiro ano de vida através do programa expandido em imunização (Expanded Program on Immunization – EPI). Com isso, em um novo trabalho, Aponte e colaboradores (2007) foram avaliar a segurança e a imunogenicidade da RTS,S na presença de um novo sistema de adjuvante, o AS02D, uma formulação pediátrica da GlaxoSmithKline, atualmente responsável pela vacina candidata contra malária a RTS, S/AS02A. O conteúdo encontrado em 0,5 mL de AS02D equivale a 0,25 mL de AS02A, composto pelos mesmos ingredientes ativos nas mesmas quantidades. Testes clínicos com essa vacina RTS,S/AS02D em crianças de 3 a 4 anos de idade, residentes em Moçambique, mostraram que essa vacina foi segura e imunogênica bem como RTS,S/AS02B. Tal resultado permite sua continuidade em crianças menores de um ano de idade (APONTE et al., 2007).

Em 2009, Polhemus e colaboradores avaliaram comparativamente a vacina RTS,S/AS02A em adultos saudáveis do Quênia, à vacina RTS,S/AS01B que contém outro sistema de adjuvante, o AS01B, o qual é composto pelos mesmos adjuvantes que o AS02A porém sob a forma de lipossomos. Este estudo mostrou que ambas as vacinas foram seguras e imunogênicas, entretanto a RTS,S/AS01B demonstrou ser mais imunogênica quando comparada a RTS,S/AS02A (POLHEMUS et al., 2009). Além desses AS outros têm sido explorados, com a finalidade de melhorar a resposta imune contra antígenos do *P. falciparum*.

O adjuvante CPG-ODN 1826, oligodeoxinucleotídeo sintético não metilado e que age em receptores específicos de cada espécie, é capaz de induzir uma potente resposta inata do tipo Th1 que confere imunidade protetora contra vários patógenos (DITTMER; OLBRICH, 2003). Crompton e colaboradores (2009) mostraram que imunizações, em indivíduos que nunca adquiriram malária, com os antígenos AMA-1 e MSP-1<sub>19</sub> de *P. falciparum* na presença de CPG-ODN 7909 induziram uma forte ativação de TLR9 e células B de memória, além de gerar uma resposta imune duradoura, evidenciando assim um potente efeito vacinal deste adjuvante.

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

O desenvolvimento de novos adjuvantes tem sido estimulado principalmente pelas desvantagens do adjuvante de alumínio, que falha na capacidade de induzir resposta células T, perde de potência se congelado e causa granulomas no local da injeção. Em muitos casos, alguns adjuvantes têm sido combinados em uma única formulação com o intuito de obter sinergismo e efeitos aditivos (revisto por REED et al., 2009).

## ***II. OBJETIVOS***

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar comparativamente a imunogenicidade da proteína recombinante baseada no domínio II (DII) de PvAMA-1 após imunizações, em camundongos, na presença de diferentes adjuvantes.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.1 Expressar e purificar as proteínas recombinantes baseadas no DII e ectodomínio inteiro (E) de PvAMA-1, a partir de *Echerichia coli*;

2.2 Avaliar a resposta de anticorpos (IgM, IgG e isotipos de IgG) induzida em camundongos BALB/c, após imunização com a proteína recombinante DII, na presença de diferentes adjuvantes visando imunizações pré-clínicas em primatas não humanos;

2.3 Caracterizar a reatividade de anticorpos monoclonais contra DII.

### ***III. MATERIAL E MÉTODOS***

---



### 3.1 Composição das soluções, tampões e meios de cultura utilizados

#### 3.1.1 Soluções e tampões para eletroforese de proteína (SDS-PAGE)

Gel de corrida: 30% acrilamida; 0,8% bis-acrilamida (Fluka Chemie); 0,75 M Tris/ 0,2% SDS pH 8,8; 0,1% persulfato de amônio; Temed 15  $\mu$ L (Invitrogen) (vol. final de 10 mL).

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

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

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

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

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

#### 3.1.2 Meios para cultura de bactérias

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

LB-kan: LB; 30  $\mu$ g/mL de kanamicina (USB).

LB-amp: LB, 100  $\mu$ g/mL de ampicilina(USB).

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

### 3.1.3 Tampões utilizados para obtenção da proteína PvAMA-1 (DII) a partir do sobrenadante dos extratos bacterianos

Tampões	Proteína PvAMA-1 (DII)
Tampão de lise	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 1mg/mL Lisozima; 1 mM PMSF
Tampão de equilíbrio (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl
Tampão de lavagem (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 1 mM PMSF; 10% Glicerol; pH final 7,0
Tampão de eluição (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 1 mM PMSF; 10% Glicerol; 250 – 400 mM Imidazol; pH final 7,0
Tampão de diálise para estoque da proteína	PBS; 1 mM PMSF

### 3.1.4 Tampões utilizados para obtenção da proteína PvAMA-1 (E) a partir dos precipitados dos extratos bacterianos (corpos de inclusão)

Tampões	AMA-1
Tampão de lise	20 mM Tris-HCl; pH 8,0; 200 mM NaCl; 10 mM EDTA; 200 µg/mL Lisozima; 2 mM PMSF
Tampão de lavagem do precipitado	10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5% Chapso
Tampão de solubilização	20 mM Tris-HCl; 500 mM NaCl; 6 M Uréia; 10% Glicerol
Tampão de equilíbrio (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 6 M Uréia; 5 mM Imidazol; 10% Glicerol
Tampão de lavagem (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 6 M Uréia; 20 mM Imidazol; 10% Glicerol
Tampão de "refolding" (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 10% Glicerol; 0,5 mM GSSG; 5 mM GSH; 0,1% Triton
Tampão de eluição (cromatografia de afinidade)	20 mM Tampão Fosfato de Sódio pH 8,0; 500 mM NaCl; 10% Glicerol; 0,5 mM GSSG; 5 mM GSH; 0,1% Triton; 300 mM Imidazol
Tampão de diálise para estoque da proteína	50 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 50% Glicerol; 0,1 mM DTT; 1 mM PMSF

### 3.1.5 Soluções e tampões para ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

Tampão para sensibilização das placas: Tampão Carbonato 0,05 M (Synth), pH 9,6 (ectodomínio PvAMA-1) e Tampão de Transferência 160 mM glicina (Synth), 25 mM Trizma base (Invitrogen), 20% metanol (PvAMA-1 (DII)).

PBS: 8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 130 mM NaCl pH final 7,4.

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

Tampão fosfato-citrato: 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Synth), 0,2 M C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> (Synth) pH final 4,5-5,0.

Solução de bloqueio:

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

Solução para diluição de amostra

i) Para ensaios de detecção de anticorpos: PBS, 5% de leite em pó desnatado (Molico<sup>®</sup>), 2,5% de BSA (Sigma).

Solução de revelação: s-Phenylenediamine (OPD, Sigma) 2 mg/mL, 0,03% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diluídos em tampão fosfato-citrato.

### 3.1.6 Soluções e tampões para “immunoblotting”.

Tampão de transferência: 160 mM glicina (Synth); 25 mM Tris (Invitrogen); 20% metanol (Merck).

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

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

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

### 3.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

#### 3.2.1 Expressão e purificação da proteína recombinante baseada no domínio II de PvAMA-1(DII)

A proteína recombinante foi obtida de acordo com o protocolo descrito recentemente pelo nosso grupo (MÚFALO et al., 2008). As bactérias recombinantes, transformadas com o plasmídeo pET-28a-*ama-1(dii)* foram cultivadas em meio LB-kanamicina (LB-kan, 30 µg/mL) por 16 horas a 37°C. A seguir, a cultura foi diluída (1:25) em LB-kan e incubada a 37°C, sob agitação a 200 rpm até atingir uma  $DO_{600}$  entre 0.5-0.6. As bactérias foram então induzidas pela adição de 0,1 mM de IPTG por 3h a 37°C. Após este período, a cultura bacteriana foi precipitada por centrifugação (3.500 rpm/15 min/4°C) e ressuspendida em tampão de lise. As bactérias foram lisadas em banho de gelo com auxílio de um sonicador (10 ciclos de 60 segundos, em pulso constante, e intervalos de 1 minuto entre os pulsos). Em seguida, o extrato bacteriano foi centrifugado (14.000 rpm/60 min/4°C) e as frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE 15%.

O sobrenadante dos extratos bacterianos contendo a proteína PvAMA-1 DII foi submetido a uma nova centrifugação (14.000 rpm/30 min/4°C) para retirada de resíduos provenientes do extrato bacteriano. O sobrenadante obtido foi aplicado, lentamente, em resina de Níquel previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio. Em seguida, a resina foi lavada com o tampão de lavagem e submetida a um gradiente linear de imidazol (15 a 400 mM) em tampão de eluição. Durante a passagem de cada tampão pela resina, as respectivas alíquotas foram recuperadas em volume de 2 mL e analisadas por SDS-PAGE 15%. As frações contendo a proteína foram reunidas e dialisadas contra PBS contendo 1 mM PMSF, durante a noite, sob constante agitação, a 4°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford.

#### 3.2.2 Expressão e purificação da proteína recombinante baseada no ectodomínio inteiro de PvAMA-1(E)

A proteína recombinante AMA-1 foi obtida de acordo com o protocolo padronizado anteriormente pelo nosso grupo (RODRIGUES et al., 2005), com

algumas modificações. Brevemente, as bactérias recombinantes *E. coli* linhagem BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pHIS-*ama-1* foram cultivadas em meio LB-Ampicilina (LB-Amp, 100 µg/mL) por 16 horas a 37°C. Após este período, a cultura foi diluída em uma razão de 1:25 em LB-Amp e incubada a 37°C até alcançar uma densidade óptica (DO<sub>600</sub>) entre 0,5-0,6. A seguir, foi adicionado 0,1 mM de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, Fermentas) à cultura bacteriana, e esta induzida por 3 horas. Após indução, o material foi centrifugado (3.500 rpm/15 min/4°C).

Posteriormente, o precipitado foi dissolvido em tampão de lise, acompanhado de incubação em banho de gelo, por 5 minutos. As bactérias foram lisadas com auxílio de um sonicador (Branson Sonifier mod. 450, EUA) utilizando-se 2 ciclos de 1 minuto e de 30 segundos, em banho de gelo. Os extratos bacterianos foram centrifugados como anteriormente e os precipitados lavados por 4 vezes com tampão de lavagem. Após as lavagens, o precipitado contendo a proteína sob forma de corpos de inclusão foi solubilizado na presença de tampão de solubilização, por 2 horas, a 37°C. Após esse período, o material foi centrifugado (14.000 rpm/30 min/4°C) e a eficiência da solubilização foi avaliada em SDS-PAGE 12%.

Para a purificação das proteínas recombinantes, o sobrenadante obtido foi aplicado em resina contendo Níquel (Ni Sepharose<sup>TM</sup> High Performance, Amersham Biosciences), previamente equilibrada com tampão de equilíbrio. Em seguida, a resina foi lavada com tampão de "refolding" contendo concentrações decrescentes de uréia. Na etapa de eluição da proteína, a resina foi incubada com o tampão de "refolding" sem o agente desnaturante, uréia e acrescido de 300 mM imidazol. O material eluído foi analisado em SDS-PAGE 12% e as frações contendo a proteína foram reunidas e dialisadas em tampão de diálise, durante a noite, sob constante agitação, a 4°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução ácida - BioAgency).

### 3.3 Adjuvantes

Os adjuvantes testados foram: 1) Adjuvante Completo de Freund - ACF (Sigma), 2) Adjuvante Incompleto de Freund - AIF (Sigma), 3) Hidróxido de Alumínio – Alum (Pierce Thermo scientific), 4) Quil A, 5) QS-21 (uma fração adjuvante enriquecida a partir do Quil A), ambos, Quil A e QS-21 foram fornecidos pela Dra. Clarissa Palatnik de Souza do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ (OLIVEIRA-FREITAS et al., 2006), 6) CpG-ODN 1826 (TCCATGACGTTCTGACGTT), IDT (Integrated DNA Technologies), 7) TiterMax Gold (Sigma) e 8) MPL-TDM (Sigma).

#### 3.3.1 Imunizações experimentais

Para as imunizações de camundongos BALB/c os adjuvantes foram utilizados nas seguintes proporções: 1) ACF/AIF (1:1), 2) Alum (25 µg/animal), 3) Quil A (25 µg/animal), 4) QS-21 (25 µg/animal), 5) CpG-ODN 1826 (10 µg/animal), 6) TiterMax Gold (1:1 somente na primeira dose), 7) MPL-TDM (1:2). O adjuvante Alum, após a preparação da emulsão, permaneceu sob agitação por aproximadamente 2 horas antes da utilização.

Grupos de 6 camundongos BALB/c, de 6-8 semanas, isogênicos, procedentes do Biotério da FCF-IQ/USP foram usados para os experimentos de imunização com a proteína recombinante. Cada animal recebeu 4 doses, sendo cada uma de 10 µg de proteína recombinante, em um volume final de 0,1 mL com intervalo de 15 dias. A imunização foi feita por via subcutânea (s.c.) nas duas patas traseiras (1ª dose) ou base da cauda (doses subseqüentes), com o antígeno emulsificado nos adjuvantes descritos acima, individualmente, ou em combinação (Alum + QS-21 e Alum + CpG-ODN 1826). No caso do adjuvante TiterMax, cada camundongo foi imunizado somente uma vez com o antígeno emulsificado neste adjuvante. Nas doses subseqüentes, os camundongos receberam somente o antígeno em diluente. A imunização foi feita pela via s.c. sendo que 25 µL da emulsão foi injetado em cada uma das 4 patas por sugestão do fabricante. Os animais dos grupos controle receberam o adjuvante diluído em PBS. As coletas de sangue foram feitas após 2 semanas de cada imunização e os soros foram separados e estocados a -20°C até a

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

Os soros obtidos foram avaliados por ELISA quanto ao reconhecimento das proteínas DII e E por anticorpos IgM, IgG e isotipos de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3).

### **3.4 Ensaios imunoenzimáticos**

#### **3.4.1 Detecção de anticorpos IgM, IgG e isotipos de IgG anti-PvAMA-1 em camundongos imunizados**

A detecção de anticorpos IgG, anti-PvAMA-1 (DII e E), nos soros de camundongos imunizados, foi feita por ELISA conforme descrito por ROSA et al. (2004). Placas de 96 poços ("high binding", Costar 3590) foram sensibilizadas com 4 µg/mL e 2 µg/mL, da proteína em tampão carbonato e tampão para transferência para E e DII respectivamente, para melhor aderência a placa, e incubada durante a noite em temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween e, em seguida, foi adicionado 200 µL/poço da solução de bloqueio. Após incubação a 37°C por 2 horas, foi adicionado 50 µL/poço de cada um dos soros diluídos a partir de 1:100 em solução de bloqueio e uma nova incubação foi realizada por mais 1 hora à temperatura ambiente. Após nova etapa de lavagem das placas com PBS-Tween, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo secundário conjugado a peroxidase (IgG de cabra anti-IgG de camundongo, KPL) diluído em solução de bloqueio. Em seguida, outra incubação foi realizada por 1 hora à temperatura ambiente com posterior lavagem com PBS-Tween por 5 vezes. A revelação foi feita pela adição de 100 µL/poço da solução de revelação. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de uma solução contendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. A DO<sub>492</sub> foi determinada em um leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA). A detecção de anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM anti-PvAMA-1 (E) em camundongos imunizados foi realizada como descrito acima, exceto que o anticorpo secundário foi substituído por anticorpos isotipo-específicos de camundongo (anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM) conjugados a peroxidase (Southern



Technologies) em uma diluição de 1:8.000. O título individual foi determinado como sendo a maior diluição do soro que apresentava  $DO_{492}$  maior do que 0,1. Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos em  $\log_{10} \pm$  desvio padrão (dp).

### 3.4.2 Caracterização da reatividade de anticorpos monoclonais contra DII

Anticorpos monoclonais anti-PvAMA-1 DII foram produzidos previamente em colaboração com a Prof. Dra. Adelaide Vaz do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (BARBEDO, 2008). A fim de caracterizar a reatividade desses monoclonais, o reconhecimento de diferentes proteínas contendo o domínio II de PvAMA-1 (DII, DI-II, DII-III e E) foi avaliado por ELISA, conforme descrito no item anterior. As proteínas DI-II e DII-III foram produzidas previamente pelo nosso grupo e já estavam disponíveis para esse ensaio (MÚFALO et al., 2008). As placas foram sensibilizadas com 4  $\mu\text{g/mL}$  (DI-II e E) ou 2  $\mu\text{g/mL}$  (DII e DII-III). Essas concentrações foram ajustadas de acordo com o reconhecimento pelo anticorpo monoclonal anti-His (GE Healthcare). Os anticorpos monoclonais (K<sub>2</sub>14, K<sub>2</sub>39, K<sub>2</sub>43, K<sub>2</sub>68 e K<sub>2</sub>72) foram testados em diferentes diluições a partir de 1:100 (2  $\mu\text{g/mL}$ ). Os resultados foram expressos em  $DO_{492} \pm$  dp.

Com a finalidade de avaliar se o reconhecimento da proteína DII pelos anticorpos monoclonais anti-DII é dependente da conformação da proteína, realizamos o ensaio de immunoblotting utilizando a proteína DII sob a forma reduzida (tampão de amostra contendo 100 mM 2-mercaptoetanol (2-ME, Bio-Rad) capaz de clivar as pontes de sulfeto e linearizar a proteína), e não reduzida (tampão de amostra sem 2-ME, mantendo a conformação da mesma). A proteína recombinante foi transferida para membrana de nitrocelulose (NC) (Hybond N, Amersham Biosciences) a uma voltagem de 100 V por 60 minutos usando equipamento "Mini Trans-Blot" (Bio-Rad). A eficiência da transferência foi feita pela coloração da membrana de NC com Ponceau-S. Em seguida, a membrana de NC foi incubada por aproximadamente 16 horas a 4°C, em solução de bloqueio. Após este período, a membrana foi incubada por 1 hora, a temperatura ambiente (t.a.), com os diferentes anticorpos monoclonais anti-DII

(K<sub>2</sub>14, K<sub>2</sub>39, K<sub>2</sub>43, K<sub>2</sub>68 e K<sub>2</sub>72) (BARBEDO, 2008), diluídos em solução de bloqueio (1:500 em uma concentração final de 0,4 µg/mL). Após três lavagens de 10 min com tampão de lavagem, foi realizada uma incubação por 1h a t.a. com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:1.000 e a revelação feita por quimiluminescência utilizando *kit* Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare).

### 3.5 Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) foi realizado em lâmina de 10 poços com esquizontes de *P. vivax* enriquecidos em Percoll® (Amershan), como descrito em LJUNGSTRÖM et al., 2004. Amostras de sangue (5-10 mL) foram coletadas, em tubos com heparina, de pacientes residentes em Manaus, AM, Brasil. Todos os pacientes foram devidamente informados e tal procedimento foi aprovado pelo comitê de pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A preparação das lâminas foi realizada em Manaus (FIOCRUZ) pela aluna do Prof. Fábio T. M. Costa, Bruna O. Carvalho. Resumidamente, após descartar o plasma, as células vermelhas foram lavadas 3 vezes e ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma) para um hematócrito de 10 %. A suspensão celular foi distribuída em tubos de 15mL (5mL em cada tubo) com Percoll® (45%). Após centrifugação, eritrócitos enriquecidos, infectados com as formas maduras, foram coletados do sobrenadante, lavados e ressuspensos em 10% de SBF. Eritrócitos infectados foram adicionados à lâmina de IFA, posteriormente fixados por 10 min em acetona e secos ao ar livre. Um “pool” de soros dos respectivos grupos imunizados, foi diluído em PBS 1:100, aplicados na lâmina e incubados por 30 min, em ambiente úmido a 37 °C. A lâmina foi excessivamente lavada com PBS e então incubada com 10 µg/mL de FITC (anticorpo de ovelha anti-IgG de camundongo marcado com fluorescência verde) (Sigma) e 100 µg/mL de DAPI (4\_,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) (Molecular Probes) por 30 min em ambiente úmido a 37 °C. Após diversas lavagens com PBS a lâmina foi selada com lamínula e avaliada em microscópio de imunofluorescência.

O ensaio de imunofluorescência líquida foi realizado no laboratório do Prof. Fábio T. M. Costa, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pela aluna Juliana Leite. Brevemente, em sangue de indivíduo infectado por *P. vivax*, enriquecido com Percoll® com uma parasitemia de 80-90%, adicionou-se SBF. Com o auxílio de uma seringa realizou-se a quebra mecânica das hemácias. Após centrifugação, a 10.000g por 3s, o sobrenadante foi coletado e reservado. Ao precipitado adicionou-se SBF para uma segunda etapa de quebra mecânica, seguida pela centrifugação de 3s a 10.000g. Os sobrenadantes foram somados e centrifugados a 10.000g por 10 min. A amostra foi incubada com paraformaldeído a 2% e em seguida lavada com SBF por duas vezes consecutivas. Posteriormente, o soro primário, do grupo imunizado com a proteína na presença de ACF/AIF, diluído em SBF, foi adicionado e então uma nova incubação de 1 hora foi realizada. Após lavar com SBF e centrifugar a 10.000g por 10 min, adicionou-se ALEXA 488® (anticorpo conjugado a um fluorocromo verde anti-IgG de camundongo) (1:150) (Molecular Probes) e incubou-se por 30 min. A amostra foi colocada em lâmina e observada no microscópio.

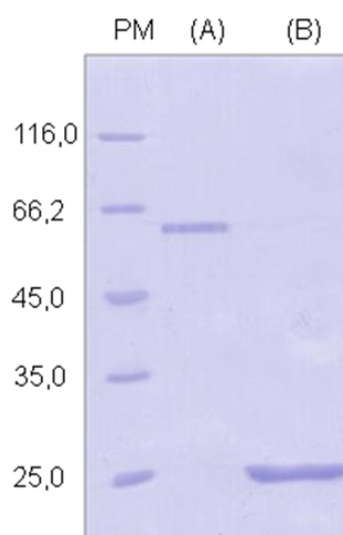
Para sinalizar os parasitas, utilizamos o reagente DAPI o qual é capaz de corar material nuclear em azul. Para controle negativo empregamos o uso do soro de camundongos imunizados apenas com o adjuvante ACF/AIF e para controle positivo o monoclonal K<sub>2</sub>43, produzido em camundongo, o qual é capaz de reconhecer a proteína PvAMA-1 (DII).

### **3.6 Análise estatística**

A análise estatística foi determinada, através do programa GraphPad PRISM 4 (média do grupo e desvio padrão). O teste de Tukey, one-way ANOVA, foi utilizado para comparar diferenças estatísticas entre as médias dos grupos imunizados.

#### 4.1 Obtenção das proteínas recombinantes

Após transformação das bactérias *E. coli* BL21 (DE3) com cada um dos plasmídeos recombinantes (pET28a-*ama1 dii* ou pHIS-*ama-1*), a expressão das proteínas recombinantes foi induzida por IPTG, como descrito em “Material e métodos” previamente. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade a partir do sobrenadante (DII) ou precipitado (E) dos extratos bacterianos. A figura 4 mostra o padrão de migração das proteínas em SDS-PAGE, em condições desnaturantes, na presença do agente redutor 2-mercaptoetanol (2-ME). Podemos observar que as proteínas migraram com um padrão de banda única, sem produtos de degradação, e com massas moleculares aparentes de: E  $\cong$  66 KDa e DII  $\cong$  26 KDa.

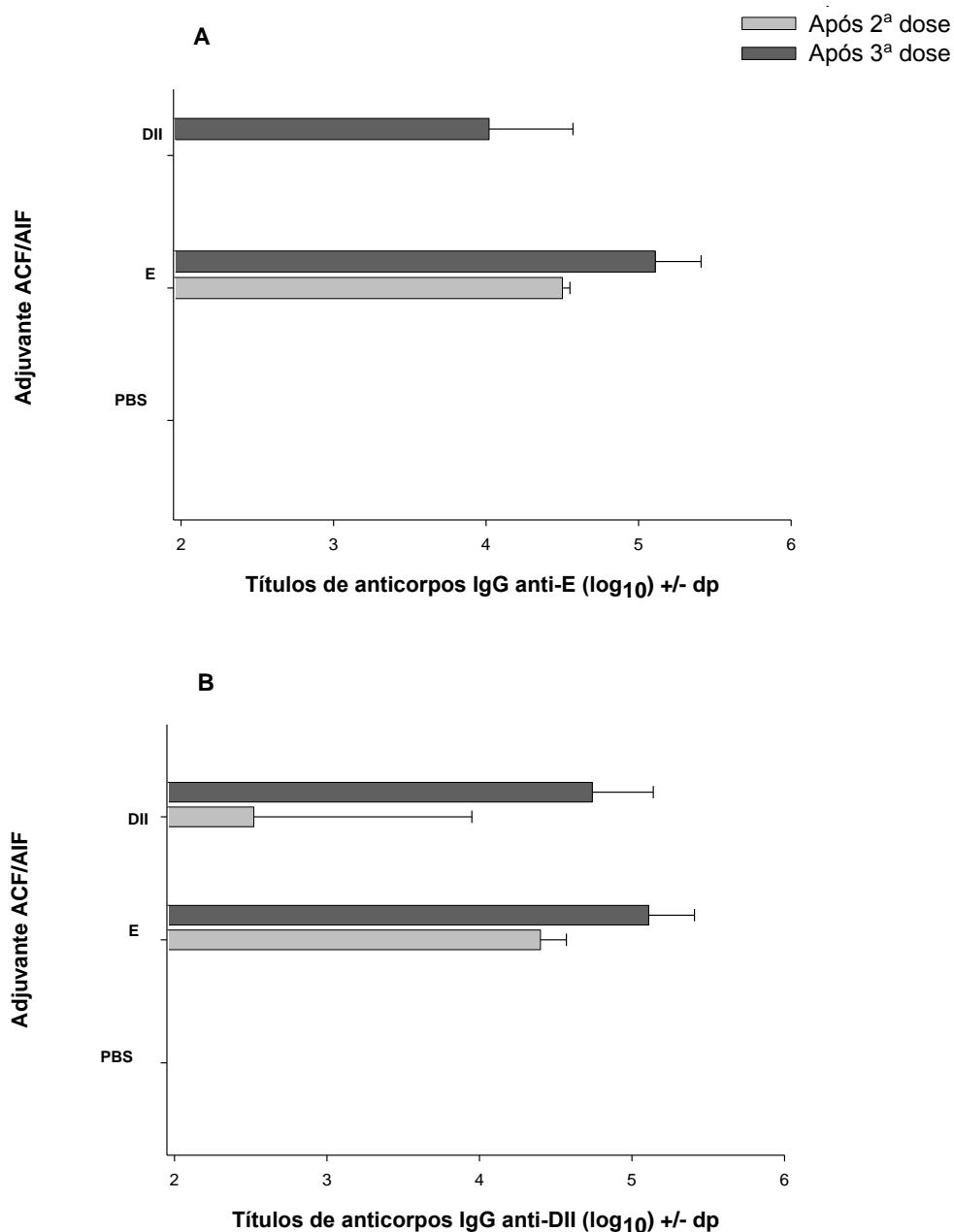


**Figura 4: Análise em SDS-PAGE das proteínas recombinantes baseadas em PvAMA1.** SDS-PAGE 12% das proteínas recombinantes purificadas correspondentes ao E (A) e DII (B) de PvAMA-1, em condições desnaturantes e após coloração com azul de Coomassie

#### 4.2 Imunizações pré-clínicas com proteínas recombinantes baseadas em PvAMA-1 (DII e E)

A utilização da proteína recombinante PvAMA-1 (E) a partir de *E. coli* para imunizações pré-clínicas apresenta algumas limitações. Uma vez que a proteína é obtida a partir de corpos de inclusão, o processo de desnaturação e

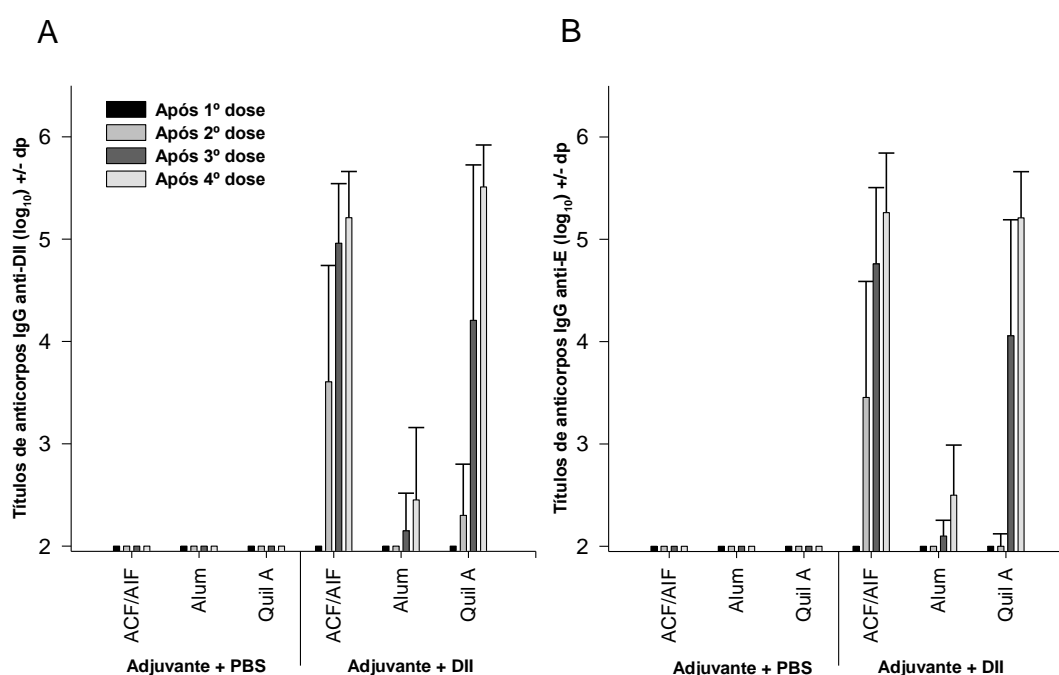
“refolding” culmina em um baixo rendimento, não sendo suficiente para futuras imunizações pré-clínicas em macacos. Uma das alternativas para contornar este problema seria a utilização de proteínas recombinantes baseadas em domínios imunodominantes de PvAMA-1 para imunizações experimentais ou utilização de outros sistemas heterólogos de expressão. Com base em nosso estudo recente mostrando que o domínio DII é particularmente imunogênico em infecções naturais (MÚFALO et al., 2008), decidimos então investir no estudo da imunogenicidade do domínio II. Para isso, realizamos imunizações experimentais em camundongos BALB/c na presença do adjuvante ACF/AIF. A Figura 5 mostra que os animais imunizados somente com DII após a segunda dose, apresentaram uma resposta contra as proteínas (E e DII) significativamente mais lenta ao serem comparados com os animais imunizados com E. Entretanto, ao final do esquema de imunização (3 doses), ambos os grupos foram capazes de produzir altos títulos de anticorpos IgG, significativamente diferentes para anti-E ( $P < 0,001$ ) e semelhantes para anti-DII ( $P > 0,05$ ). Assim, pode-se concluir que imunizações com o DII foram capazes de induzir níveis tão altos de anticorpos IgG, quanto imunizações com o ectodomínio inteiro. A partir deste experimento, decidimos então realizar imunizações experimentais utilizando um único domínio de PvAMA-1, o qual apresenta a vantagem de ser solúvel.



**Figura 5: Análise comparativa dos títulos de anticorpos IgG após imunizações em camundongos BALB/c com as proteínas baseadas em PvAMA-1.** Os animais (n=6) foram imunizados com três doses contendo 10  $\mu$ g de cada proteína recombinante emulsificada em adjuvante ACF/AIF. Após 2 semanas de cada imunização os soros dos animais foram coletados e testados individualmente, por ELISA, contra E(A) e DII (B). Os resultados estão expressos como média dos títulos de anticorpos de cada grupo em escala logarítmica ( $\log_{10}$ ) +/- desvio-padrão (dp).

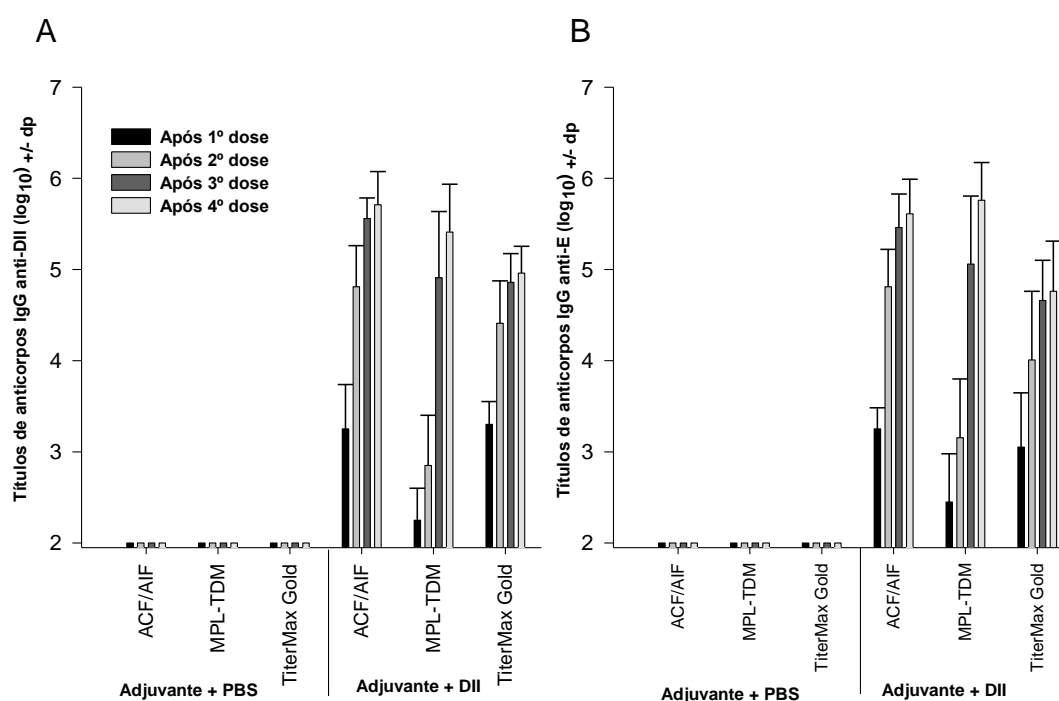
### 4.3 Imunizações pré-clínicas com a proteína DII na presença de diferentes adjuvantes

Para avaliar a resposta por anticorpos induzida após imunizações com DII, realizamos imunizações experimentais em camundongos BALB/c, na presença de diferentes adjuvantes. Soros obtidos após 14 dias de cada imunização, com DII na presença dos diferentes adjuvantes, foram avaliados quanto ao reconhecimento de E e DII por ELISA. A imunogenicidade da proteína foi avaliada comparativamente com a finalidade de selecionar adjuvantes fortes, assim como o adjuvante de Freund, para futuras imunizações em primatas não humanos, uma vez que não é permitida a utilização deste adjuvante em primatas humanos e não humanos. Os experimentos iniciais foram realizados em três etapas de acordo com a disponibilidade de cada adjuvante: experimento 1 - ACF/AIF, Alum, Quil A, experimento 2 - ACF/AIF, MPL-TDM, TiterMax Gold, experimento 3 – ACF/AIF, QS-21 e CpG-ODN 1826.



**Figura 6: Comparação da resposta de anticorpos IgG após imunizações de camundongos BALB/c com DII na presença dos adjuvantes ACF/AIF, Alum e Quil A.** Grupos de 6 camundongos BALB/c foram imunizados s.c. com quatro doses de proteína (10 µg), emulsificada nos diferentes adjuvantes, com intervalo de 2 semanas entre cada dose. Os resultados estão expressos em log<sub>10</sub> +/- dp dos títulos de IgG total, medidos por ELISA contra DII (A) e E (B) de PvAMA-1, 14 dias após cada imunização.

A Figura 6 mostra que, após a segunda dose, os camundongos imunizados com DII em ACF/AIF apresentaram níveis de anticorpos contra PvAMA-1 significativamente mais altos que os imunizados na presença dos demais adjuvantes (Alum e Quil A). Entretanto, após a terceira dose, observou-se um aumento nos níveis de anticorpos dos animais imunizados na presença de Quil A; Acreditamos ter havido problemas na primeira imunização, pois as respostas dos animais que receberam a proteína em ACF foram surpreendentemente baixas, quando comparada com os resultados dos experimentos subseqüentes (figuras 7 e 8);



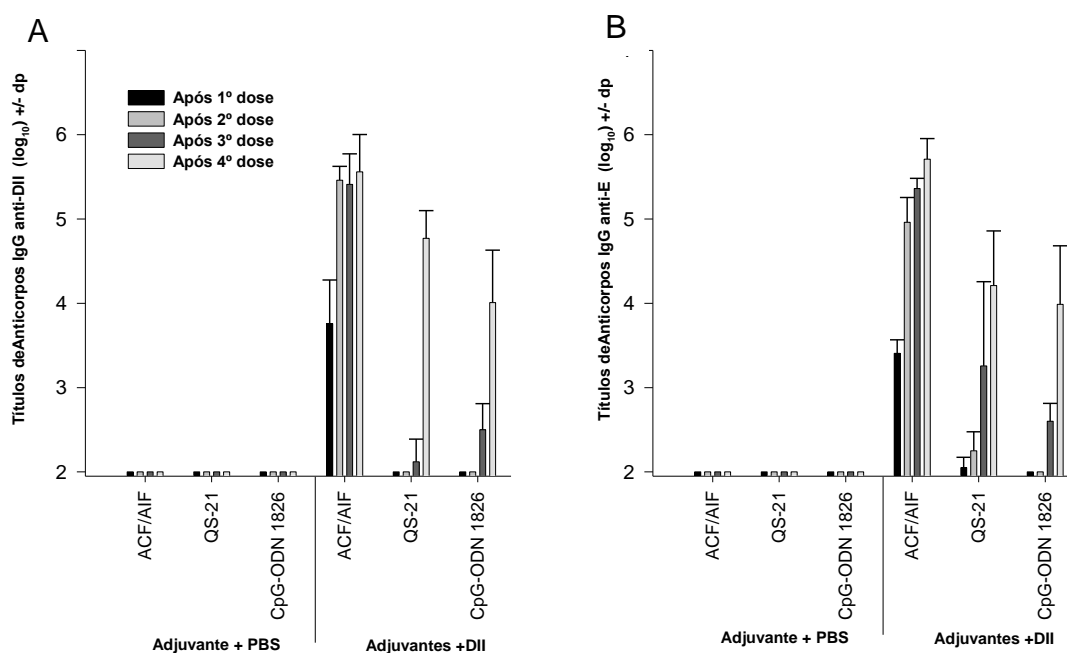
**Figura 7: Comparação da resposta de anticorpos IgG após imunizações de camundongos BALB/c com DII na presença dos adjuvantes ACF/AIF, MPL-TDM e TiterMax Gold.** Grupos de 6 camundongos BALB/c foram imunizados s.c. com quatro doses de proteína (10 µg) emulsificada nos diferentes adjuvantes comerciais, com intervalo de 2 semanas entre cada dose. Os resultados estão expressos em log<sub>10</sub> +/- dp dos títulos de IgG total, medidos por ELISA contra DII (A) e E (B) de PvAMA-1, 14 dias após cada imunização.

No segundo experimento (figura 7), observamos que logo após a primeira dose, os camundongos imunizados com DII em ACF/AIF ou TiterMax apresentaram níveis de anticorpos contra PvAMA-1 similares entre si e mais altos que os imunizados na presença de MPL-TDM. De forma semelhante ao



observado para Quil A no experimento anterior, observou-se um aumento nos níveis de anticorpos dos animais imunizados na presença de MPL-TDM, após a terceira dose.

Por último, testamos mais dois diferentes adjuvantes (Figura 8). Neste experimento observamos que, mesmo após 4 doses, os títulos de anticorpos IgG dos grupos imunizados na presença dos adjuvantes QS-21 e CpG-ODN foram significativamente mais baixos em relação ao grupo do adjuvante ACF/AIF. Além disso, pode-se observar uma diferença entre o reconhecimento de DII e E pelos anticorpos gerados após a 3<sup>a</sup> imunização com DII na presença de QS-21.



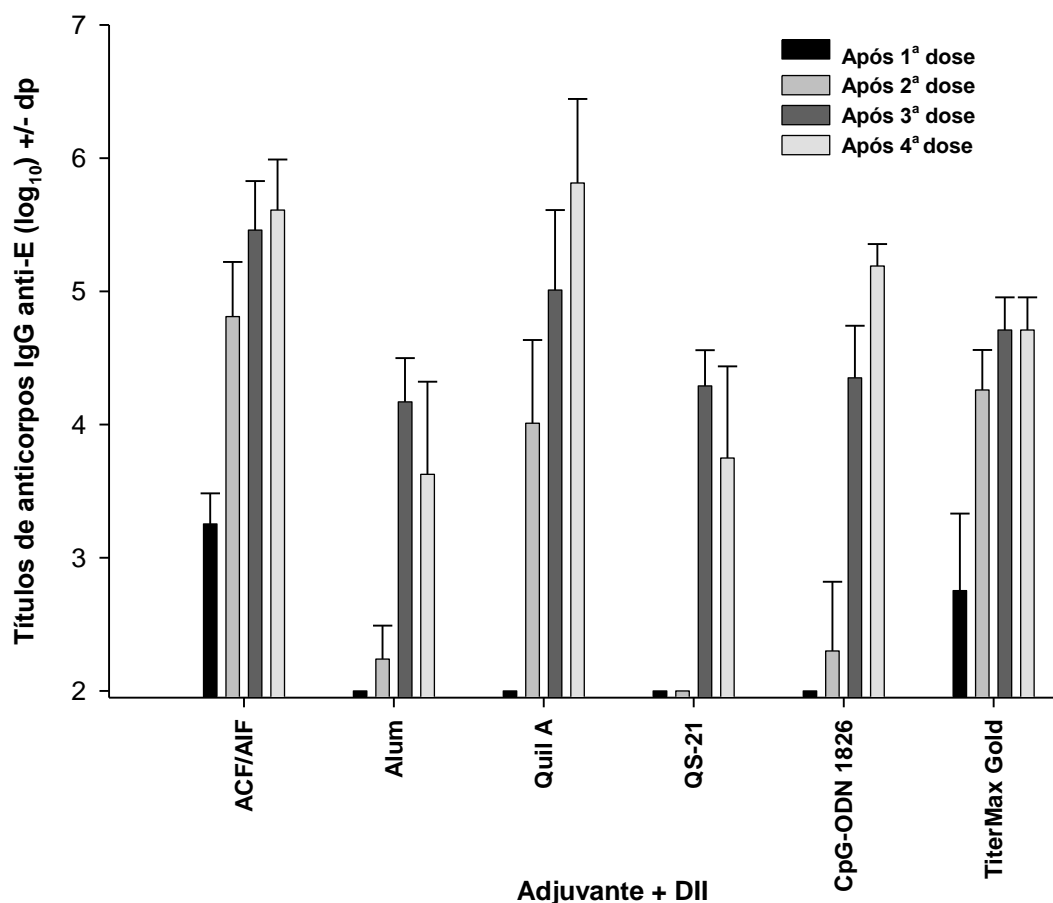
**Figura 8: Comparação da resposta de anticorpos IgG após imunizações de camundongos com DII na presença dos adjuvantes ACF/AIF, QS-21 e CPG-ODN 1826.** Grupos de 6 camundongos BALB/c foram imunizados s.c. com quatro doses de proteína (10 µg) emulsificada nos diferentes adjuvantes, com intervalo de 2 semanas entre cada dose. Os resultados estão expressos em log<sub>10</sub> +/- dp dos títulos de IgG total, medidos por ELISA contra DII (A) e E (B) de PvAMA-1, 14 dias após cada imunização.

Nas tabelas A.1, A.2 e A.3 (em anexo) estão apresentados os resultados dos valores de *P* após a comparação entre os títulos de anticorpos obtidos dos diferentes grupos de animais (ANOVA), após cada imunização. Não estão incluídos nessa análise os grupos controles (imunizados somente com

adjuvante) uma vez que não apresentaram resposta de anticorpos para o antígeno em questão.

Em conjunto, os três experimentos realizados mostram que, ao final do esquema de imunização (4 doses), os adjuvantes Quil A e MPL-TDM foram capazes de induzir níveis de anticorpos similares aos adjuvantes TiterMax e ACF/AIF (figuras 6 e 7). Em geral, as respostas de anticorpos para DII e ectodomínio foram semelhantes, exceto do grupo imunizado com QS-21 e CpG-ODN 1826 (experimento 3), onde observamos que a resposta de anticorpos para DII só foi detectada após a 3<sup>o</sup> dose. Os animais controles imunizados apenas com adjuvante não apresentaram resposta de anticorpos específicos contra nenhuma das proteínas testadas.

Posteriormente, realizamos um novo experimento em que todos os adjuvantes foram testados paralelamente, sob as mesmas condições, para confirmar os resultados anteriores. Infelizmente, não foi possível reavaliar o adjuvante MPL-TDM uma vez que não se encontrava mais disponível no mercado. Nesta etapa, confirmamos que, mesmo após 4 doses de imunização, os grupos imunizados com a proteína na presença dos adjuvantes Alum e QS-21, não atingiram títulos de anticorpos semelhantes ao grupo imunizado com a proteína emulsificada com o adjuvante de Freund (Figura 9). Na tabela A.4 (em anexo) estão apresentados os resultados dos valores de *P* após comparação entre os títulos de anticorpos obtidos dos diferentes grupos de animais (ANOVA), após cada imunização. Os grupos controles não estão incluídos nessa análise, uma vez que estes não apresentaram anticorpos contra as proteínas recombinantes baseadas em PvAMA-1 (figuras 6, 7 e 8).

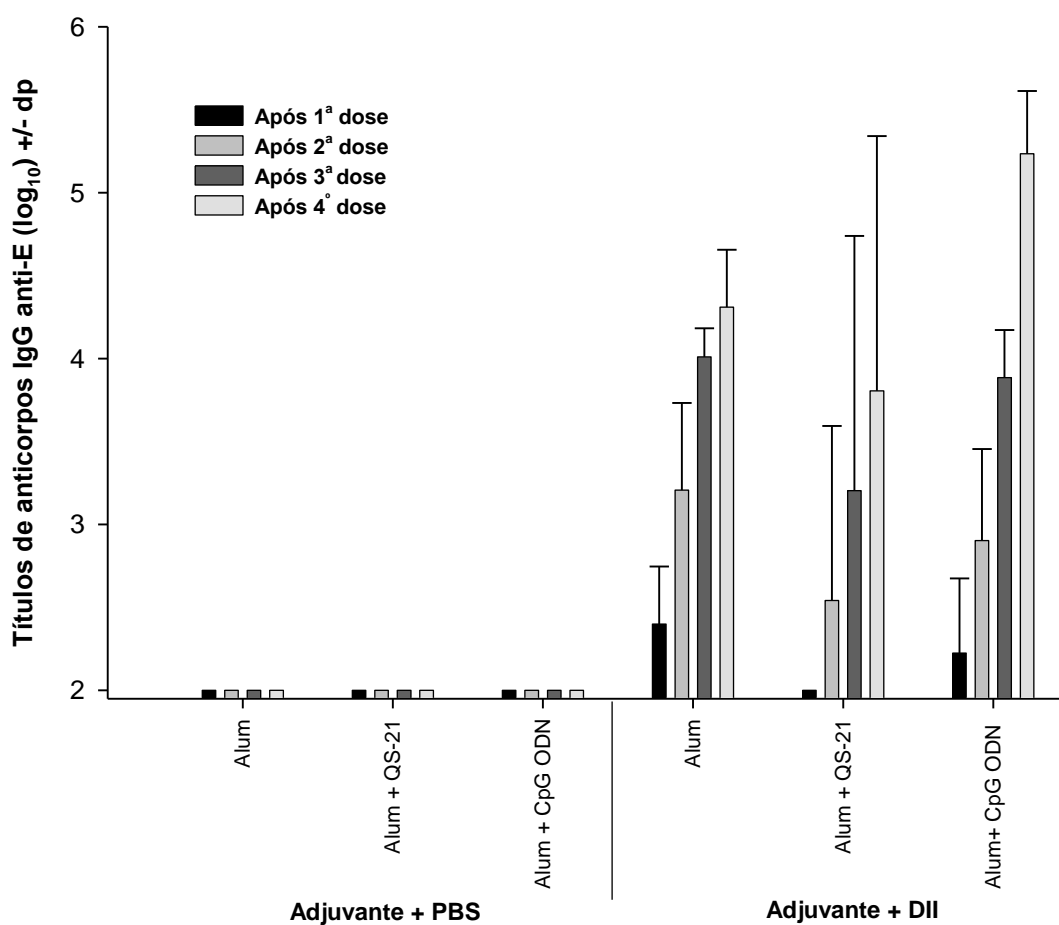


**Figura 9: Magnitude da resposta de anticorpos IgG após imunizações de camundongos BALB/c com DII na presença dos adjuvantes ACF/AIF, Alum, Quil A, QS-21, CpG-ODN 1826 e TiterMax Gold.** Grupos de 6 camundongos BALB/c receberam quatro doses de proteína (10 µg) na presença dos adjuvantes indicados, com intervalo de 2 semanas entre cada dose. Os resultados estão expressos  $\log_{10}$  +/- dp dos títulos de IgG total, medidos por ELISA contra o ectodomínio de PvAMA-1, 14 dias após cada imunização. Os resultados são representativos de dois experimentos com resultados semelhantes entre si

Dos adjuvantes testados, o único liberado para uso no homem é o Alum. Por essa razão utilizamos esse adjuvante de forma combinada aos adjuvantes QS-21 ou CpG-ODN 1826 para avaliar um possível sinergismo entre esses eles. Neste experimento (Figura 10), observamos que das combinações testadas, a formulação Alum + CpG-ODN foi capaz de induzir títulos de anticorpos IgG estatisticamente mais altos do que o grupo que recebeu apenas Alum ( $P < 0,05$  one-way ANOVA), demonstrando um aumento no título de

anticorpos quando comparado a imunizações com a proteína emulsificada apenas em Alum.

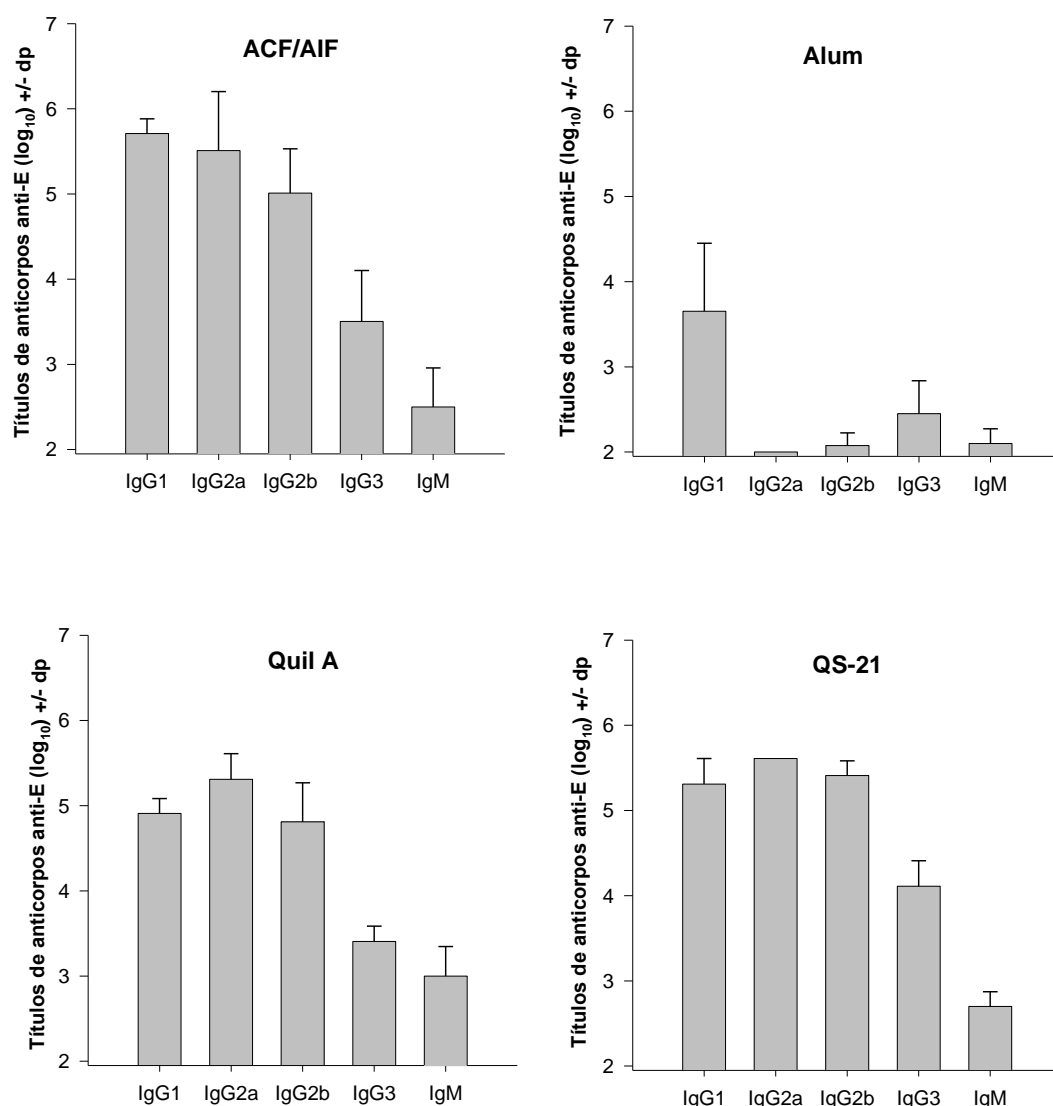
Na tabela A.5 (em anexo) estão apresentados os resultados dos valores de *P* após a comparação entre os títulos de anticorpos obtidos dos diferentes grupos de animais (ANOVA), após cada imunização.

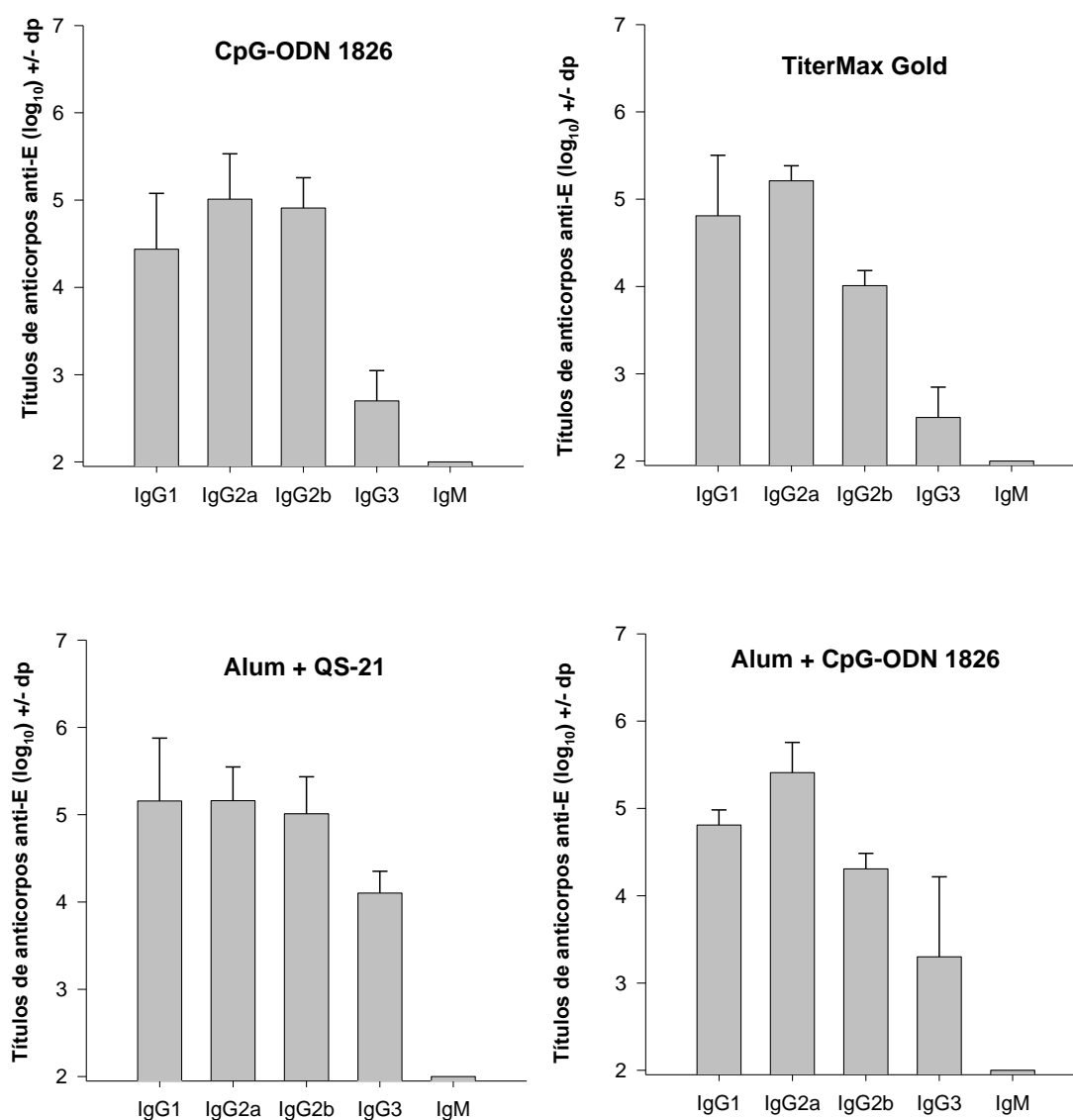


**Figura 10: Efeito comparativo da administração da proteína DII em camundongos BALB/c, na presença de combinações de adjuvantes.** Grupos de 6 camundongos BALB/c foram imunizados s.c. com quatro doses da proteína (10 µg) na presença dos adjuvantes Alum, Alum + QS-21 e Alum + CpG-ODN 1826. Os resultados estão expressos como log<sub>10</sub> +/- dp dos títulos de anticorpos IgG, medidos por ELISA contra o ectodomínio de PvAMA-1, 14 dias após cada imunização.

Posteriormente foram avaliados a presença de isotipos de IgG e IgM após o regime de imunizações. A análise dos isotipos de IgG e IgM demonstrou um predomínio de IgG1 e IgG2 caracterizando um padrão de resposta mista

Th1/Th2 para a maioria dos grupos testados. O adjuvante Alum é um indutor de resposta do tipo Th2, o que pode ser comprovado pelos altos títulos de IgG1 detectados. A utilização combinada do adjuvante Alum com QS-21 ou CpG-ODN 1826 levou a um aumento considerável dos títulos de anticorpos IgG2a, IgG2b e IgG3, melhorando a resposta do tipo Th1. A Figura 11 ilustra comparativamente a magnitude da resposta dos diferentes anticorpos induzidos nos grupos de animais imunizados.



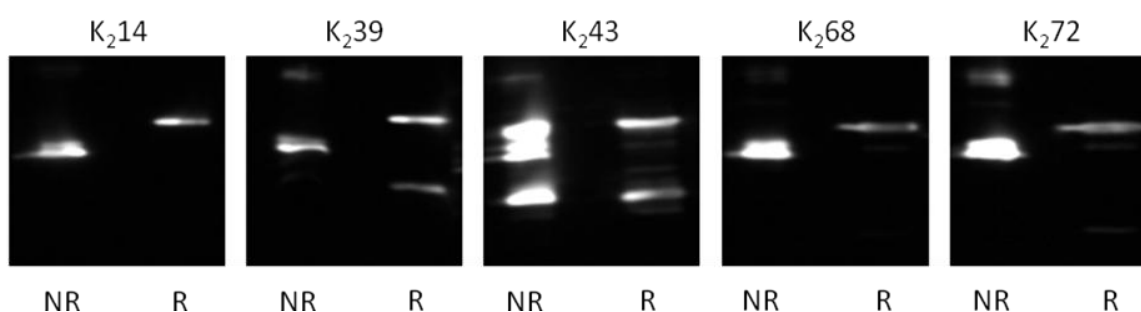


**Figura 11: Avaliação da resposta de anticorpos IgM e isotipos de IgG anti-PvAMA-1 nos soros de camundongos imunizados com DII na presença dos diferentes adjuvantes testados.** Os animais foram imunizados como descrito na legenda da figura 10. Os soros foram coletados duas semanas após a 4<sup>o</sup> dose e testados quanto ao reconhecimento por anticorpos IgM e isotipos de IgG. Os resultados estão expressos em log<sub>10</sub> +/- dp dos títulos de anticorpos anti-PvAMA-1.

#### 4.4 Caracterização da reatividade de anticorpos monoclonais anti-domínio II de PvAMA-1

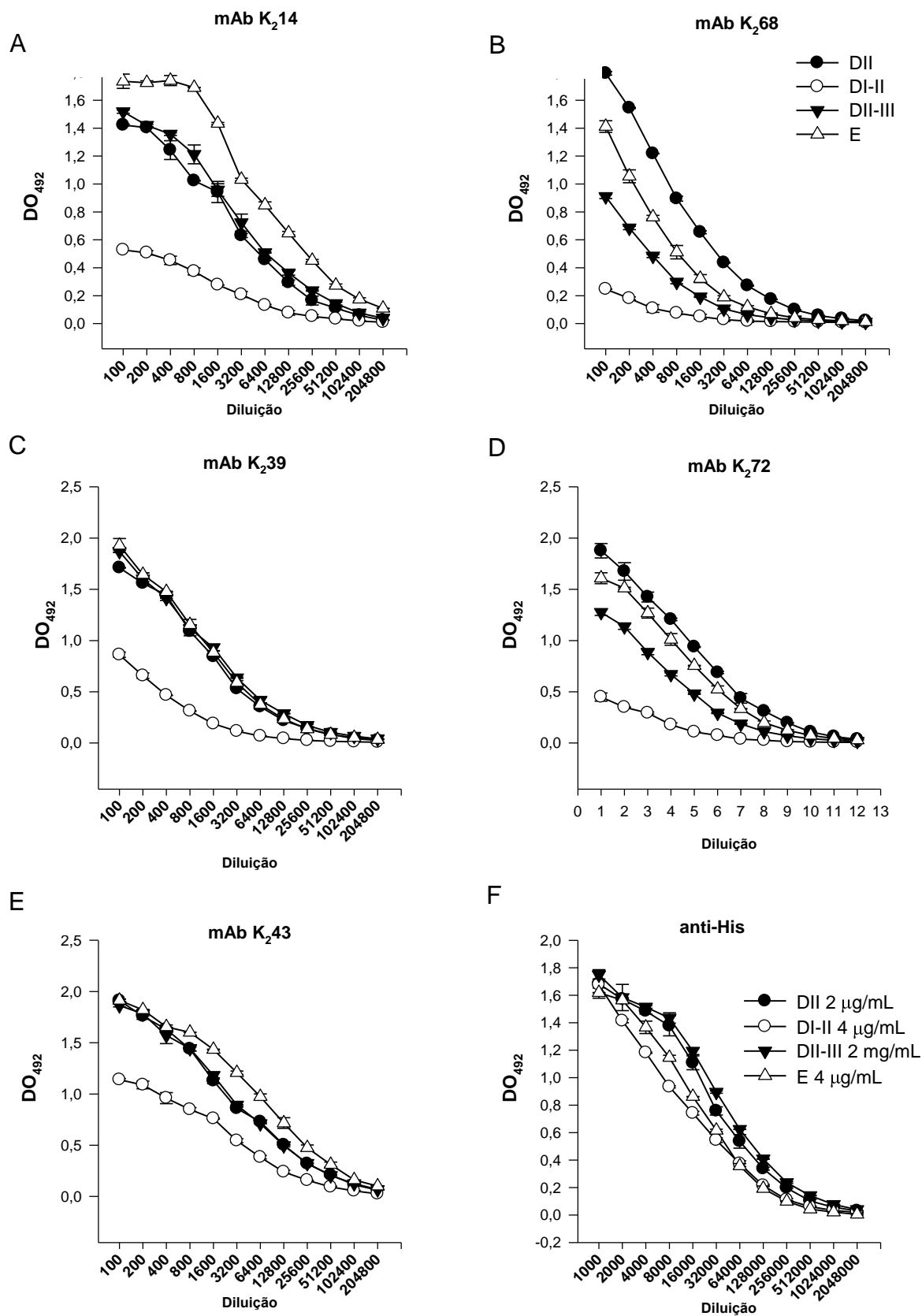
Em paralelo aos estudos de indução de anticorpos policlonais anti-DII em camundongos, na presença de diferentes adjuvantes, geramos também anticorpos monoclonais visando o estabelecimento de ensaios funcionais de ligação da PvAMA-1 ao eritrócito e a possível capacidade desses anticorpos em inibir essa ligação (BARBEDO, 2008). No presente estudo, nos

concentramos em caracterizar a reatividade desses anticorpos monoclonais avaliando a natureza do epítipo reconhecido (conformacional ou linear) e se esses epítipos estão presentes em diferentes proteínas contendo o domínio II: DI-II, DII-III e ectodomínio inteiro, além da proteína homóloga DII. Cinco anticorpos monoclonais foram obtidos e denominados K<sub>2</sub>14, K<sub>2</sub>39, K<sub>2</sub>43, K<sub>2</sub>68 e K<sub>2</sub>72. Inicialmente, esses anticorpos foram testados por imunoblotting quanto ao reconhecimento da proteína DII em condições redutoras (presença de 2-ME) e não redutoras (ausência de 2-ME). Podemos observar que todos os anticorpos monoclonais reconhecem a proteína tanto na presença, como na ausência de 2-ME, sugerindo que o reconhecimento do epítipo é independente da conformação da mesma (Figura 12).



**Figura 12: Análise por imunoblotting da proteína recombinante PvAMA-1 (DII) em condições não redutoras (NR) e redutoras(R).** Anticorpos monoclonais (K<sub>2</sub>14, K<sub>2</sub>39, K<sub>2</sub>43, K<sub>2</sub>68 e K<sub>2</sub>72) foram avaliados quanto ao reconhecimento de DII em condições não redutoras e redutoras (com 2-ME).

Posteriormente, verificamos se os epítipos reconhecidos por cada um dos anticorpos monoclonais estariam expostos em diferentes proteínas contendo o domínio II. A análise do reconhecimento foi feita por ELISA utilizando placas sensibilizadas com as proteínas DI-II, DII-III e DI-III (E), além da própria DII. A figura 13 mostra que todos os anticorpos monoclonais reconheceram tanto a proteína homóloga, quanto as proteínas heterólogas. A proteína reconhecida em menor intensidade por todos os anticorpos monoclonais testados foi DI-II (figura 13A-E). Esta diferença no reconhecimento não foi resultante de uma menor quantidade de proteína que se ligou na placa, pois todas foram reconhecidas de forma semelhante pelo anticorpo monoclonal anti-his (figura 13F).

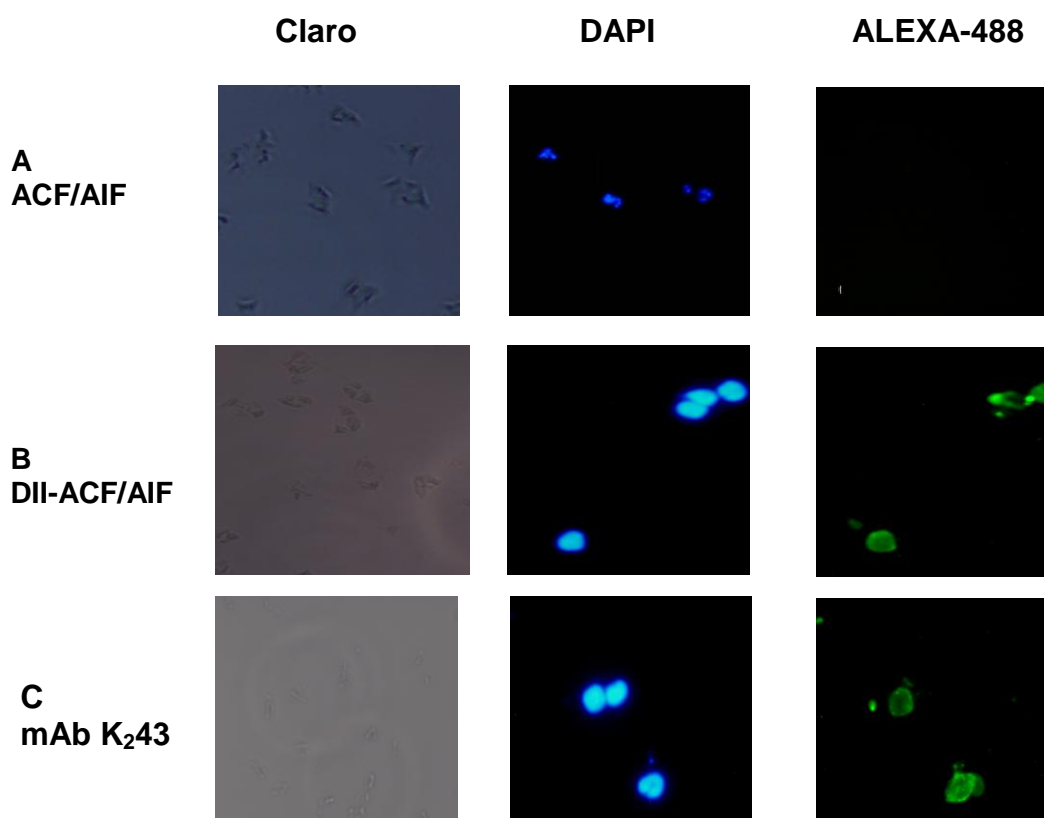


**Figura 13: Análise da reatividade de anticorpos monoclonais anti-DII.** Placas de ELISA foram sensibilizadas com DII (2 µg/mL), DI-II (4 µg/mL), DII-III (2 µg/mL) e E (4 µg/mL) e avaliadas quanto ao reconhecimento por monoclonais anti-DII. Os resultados estão expressos em  $DO_{492} \pm dp$ .



#### **4.5 Reconhecimento da proteína nativa expressa em merozoítas de *P. vivax* por anticorpos anti-PvAMA-1 DII (policlonais e monoclonais)**

Em experimentos iniciais de imunofluorescência indireta em lâminas contendo esquizontes de *P. vivax* fixados, observamos que os anticorpos policlonais anti-DII não foram capazes de reconhecer a proteína nativa (dados não mostrados). Com o objetivo, de testar a hipótese de que este antígeno talvez não estaria exposto quando na forma de esquizonte, decidimos avaliar o reconhecimento do parasita em ensaio de imunofluorescência líquida, utilizando amostras com merozoítas livres. Desta forma, podemos observar na figura 14B que os soros dos camundongos imunizados com DII na presença de ACF/AIF foram capazes de reconhecer o parasita. Resultados semelhantes foram observados com os soros dos animais imunizados com a proteína na presença de Alum e CPG-ODN 1826 (dados não mostrados). Assim, não só os epítomos são preservados na proteína recombinante, como eles são capazes de gerar anticorpos em camundongos que reconhecem os mesmos epítomos presentes no parasita. Outro fato importante foi a observação de que o anticorpo monoclonal K<sub>243</sub> também foi capaz de reconhecer a proteína nativa por imunofluorescência (figura 14C). Os outros quatro anticorpos monoclonais não foram testados devido a limitação de lâminas contendo parasitas.



**Figura 14: Ensaio de imunofluorescência líquida com soros de camundongos BALB/c após imunizações com DII na presença do adjuvante ACF/AIF.** Merozoítas livres foram incubados com soros de camundongos imunizados (1:100) e adicionados a lâminas de IFA. Em seguida a incubação, os anticorpos IgG que se ligaram aos parasitas foram marcados por anticorpos de cabra anti-IgG de camundongos conjugados a FITC e o núcleo dos parasitas foram marcados com DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride). Em A, grupo controle negativo, grupo imunizado apenas com o adjuvante ACF/AIF; B, anticorpos produzidos contra a proteína recombinante PvAMA-1(DII) emulsificada em ACF/AIF, foram capazes de reconhecer, em merozoítas livres, a proteína em sua forma nativa; C, anticorpos monoclonais mAb K<sub>2</sub>43 reconheceram merozoítas livres, controle positivo.

## ***V. DISCUSSÃO***

---

Nos últimos anos, vários artigos de revisão têm chamado atenção para a importância dos estudos com o *P. vivax*, parasita considerado altamente negligenciado, quando comparado ao *P. falciparum*. Isso se deve, principalmente, aos recentes relatos de aumento dos casos graves de malária causada por *P. vivax*, historicamente considerado uma espécie causadora de doença “benigna” (GENTON et al., 2008; TJITRA et al., 2008; KOCHAR et al., 2009). Dentre as dificuldades para a realização de estudos com *P. vivax*, as principais são: i) a falta de um sistema eficiente de cultivo *in vitro*; ii) baixas parasitemias em indivíduos infectados; iii) ensaios funcionais restritos a poucos laboratórios e, iv) ausência de um modelo de infecção para ensaios de proteção. Conseqüentemente, a pesquisa focando o desenvolvimento de vacinas contra malária *vivax* tem recebido menos atenção e investimentos financeiros, apesar da ampla distribuição geográfica desta espécie e relatos de parasitas resistentes às drogas comumente utilizadas para tratamento de pacientes, como a cloroquina e primaquina.

Nos últimos anos nosso grupo tem realizado diversos estudos imunológicos com proteínas recombinantes, baseadas em antígenos de merozoítas de *P. vivax*, os quais são considerados potenciais candidatos a comporem uma vacina contra as formas sanguíneas da malária. Nestes estudos, demonstramos que proteínas recombinantes representando a MSP1<sub>19</sub> e AMA-1 são altamente reconhecidas por anticorpos IgG de indivíduos brasileiros infectados por *P. vivax* (COELHO et al., 2007; MORAIS et al., 2005; MÚFALO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2003; 2005; SOARES et al., 1997, 1999a,b). No caso específico da resposta anti-AMA-1, foi demonstrada uma significativa redução de risco de malária clínica associada à presença de anticorpos contra o ectodomínio da proteína em indivíduos de áreas endêmicas de malária (MORAIS et al., 2006).

Com base nesses estudos, recentemente geramos cinco novas proteínas recombinantes baseadas nos diferentes domínios de AMA-1, com o intuito de mapear as regiões mais imunogênicas da proteína (MÚFALO et al., 2008). Neste estudo, observamos que proteínas contendo o DII (DII, DI-II, DII-III) foram altamente reconhecidas por anticorpos IgG de indivíduos infectados de áreas endêmicas de malária, demonstrando que este domínio poderia ser um potencial candidato a compor uma vacina de sub-unidade contra malária *vivax* (MÚFALO et al., 2008). Para testar essa hipótese, nos propusemos, no presente estudo, a avaliar as

propriedades imunogênicas do domínio II, quando administrado em camundongos na presença de diferentes adjuvantes. Do ponto de vista prático, o uso do domínio II individualmente tem a vantagem de ter sido obtido de forma solúvel e em quantidades satisfatórias. Por outro lado, as proteínas baseadas no ectodomínio inteiro e demais subdomínios, foram obtidas a partir de corpos de inclusão, após desnaturação e “refolding” parcial, resultando em rendimentos finais insuficientes para futuros estudos pré-clínicos em macacos (RODRIGUES et al., 2005; MÚFALO et al., 2008). Que seja do nosso conhecimento, esse é um estudo pioneiro envolvendo imunizações pré-clínicas com um único domínio de AMA-1 de *P. vivax*.

Inicialmente, avaliamos a imunogenicidade de DII em camundongos na presença do adjuvante de Freund (ACF/AIF). Para efeito comparativo, nos experimentos iniciais utilizamos uma proteína recombinante baseada no ectodomínio (E). Nosso objetivo foi verificar se a imunização com DII seria capaz de induzir títulos tão altos de anticorpos, quanto os induzidos pela imunização com o ectodomínio inteiro, já demonstrado previamente pelo nosso grupo (MÚFALO al., 2008). Esta determinação foi feita por ELISA utilizando placa sensibilizada com cada uma das proteínas recombinantes (E ou DII). Após o término do esquema de imunizações (3 doses), concluímos que a imunização apenas com o domínio II de PvAMA-1 foi tão eficiente quanto a imunização feita com a proteína baseada no ectodomínio inteiro (Figura 5). Estes dados sugerem que os epítomos importantes para a indução da resposta de anticorpos estão expressos na proteína recombinante baseada DII.

Com base nestes resultados, decidimos dar continuidade as imunizações pré-clínicas em camundongos utilizando a proteína DII formulada na presença de diferentes adjuvantes, uma vez que o ACF não é permitido para uso em imunizações de primatas. Apesar dessa restrição, o ACF é amplamente utilizado para estudos que avaliam a imunogenicidade de antígenos no modelo murino, e promove altos títulos de anticorpos IgG. Deste modo decidimos manter o uso do ACF como um padrão ouro de resposta esperada após as imunizações com o DII. Para isso, três experimentos independentes foram realizados, em que imunizações com DII na presença de dois diferentes adjuvantes foram comparadas às imunizações na presença de ACF/AIF. No primeiro experimento observamos que após a 3ª dose, o grupo que recebeu a proteína emulsificada em Quil A apresentou títulos de anticorpos IgG anti-DII e anti-E semelhantes aos gerados pelas imunizações na

presença de ACF/AIF. Por outro lado, mesmo após 4 doses o grupo imunizado com a proteína na presença do adjuvante Alum não atingiu títulos de IgG semelhantes ao grupo ACF/AIF (Figura 6). Consideramos essa informação importante, pois o Alum é um dos poucos adjuvantes licenciados para uso no homem além de ser utilizado em outras formulações vacinais disponíveis comercialmente, as quais são baseadas em proteínas recombinantes, como a vacina contra a hepatite B (vários fabricantes) e HPV (Gardasil®, Merck). Em estudos clínicos preliminares (STOUTE et al., 1997), a vacina recombinante RTS,S contra a malária *falciparum* foi formulada em Alum + MPL (SBAS4), a qual foi muito menos potente do que a emulsão atualmente utilizada em testes clínicos de fase 2, que consiste em MPL + QS-21, em água e óleo (SBAS2). Esse fato reforça a importância de se buscar adjuvantes alternativos para uso com proteínas recombinantes de malária.

Dando continuidade aos estudos comparativos, avaliamos a eficiência dos adjuvantes MPL-TDM e TiterMax Gold. Observamos que logo após a 1ª dose o grupo imunizado na presença do adjuvante TiterMax apresentou títulos de IgG semelhantes ao grupo ACF/AIF, demonstrando que este constitui-se em um potente adjuvante para imunizações com PvAMA-1. Em alguns estudos de imunização que utilizaram o adjuvante TiterMax, ausência ou baixos títulos de anticorpos foram observados quando comparados ao adjuvante de Freund (LEENAARS et al., 1994; ZWARGER et al., 1998). Entretanto, além do nosso trabalho, outros estudos demonstraram seu potencial antigênico promovendo altos títulos de IgG após sua utilização (BERHANU et al., 2008; HAÇARIZ et al., 2009). Títulos mais baixos, porém consideráveis, foram também obtidos quando a proteína foi administrada na presença do adjuvante MPL-TDM (Figura 7). Infelizmente, não foi possível dar continuidade às imunizações utilizando esse último adjuvante, pois o fornecimento do mesmo foi descontinuado pelo fabricante.

Em um novo experimento de imunizações avaliamos os adjuvantes, QS-21 e CpG-ODN 1826. Os títulos de IgG obtidos com os mesmos foram significativamente mais baixos quando comparados ao grupo ACF/AIF (Figura 8). A utilização destes dois adjuvantes tem sido bastante explorada em estudos para o desenvolvimento de vacinas. Trabalhos com sistemas de adjuvantes baseados em QS-21 e MPL, como a atual candidata a vacina contra malária, RTS,S, demonstram a grande influência destes adjuvantes na produção de anticorpos (revisto por REED et al., 2009). Já o

CpG-ODN têm sido bastante utilizado para melhorar a produção de anticorpos e principalmente para direcionar a resposta para o tipo Th1 (KUMAR et al., 2004; QIAN et al., 2008; BARGIERI et al., 2008). De um modo geral, as respostas de anticorpos IgG para as duas proteínas testadas (DII e ectodomínio) foram semelhantes nos três experimentos iniciais. Por essa razão, nos experimentos subsequentes, foram determinados apenas os títulos de anticorpos contra o ectodomínio.

Para validar estes resultados iniciais, um novo experimento foi realizado, utilizando a proteína DII formulada nos mesmos adjuvantes previamente testados (exceto MPL-TDM), em paralelo. A análise dos resultados mostra que os dados dos três experimentos independentes realizados anteriormente foram confirmados, exceto que o grupo imunizado com CpG-ODN 1826 atingiu, após a 4ª dose, níveis de anticorpos IgG semelhantes ao grupo imunizado em ACF/AIF (Figura 9).

A fim de avaliar se seria possível melhorar a eficiência da imunização com DII na presença de Alum, decidimos testar a possibilidade de obter-se um efeito sinérgico na resposta de anticorpos através da utilização combinada de Alum com os adjuvantes QS-21 ou CpG-ODN 1826. Os dados mostram que, após 4 doses, somente o grupo imunizado na presença de Alum + CpG-ODN 1826 apresentou títulos de anticorpos IgG significativamente mais altos do que o grupo Alum (Figura 10).

Resultados semelhantes foram observados em estudos clínicos de Fase 1 com AMA-C1/Alhydrogel (contêm o ectodomínio PfAMA-1 de duas cepas diferentes FVO e 3D7 emulsificados em Alum) na presença de CpG 7909, os quais promoveram títulos de anticorpos IgG expressivos quando comparados a imunizações na ausência de CpG-ODN (MULLEN et al., 2006), assim como imunizações pré-clínicas em camundongos com a proteína recombinante MSP-1<sub>19</sub> de *P. yoelii*, produzida em *Pichia pastoris*, na presença de Montanide ISA 51 e CpG-ODN (KUMAR et al., 2004). Por outro lado, imunizações pré-clínicas em coelhos com a proteína recombinante, expressa em levedura, TBV25-28 (fusão das proteínas Pfs25 e Pfs28 presentes nas formas zigoto e oocineto do parasita) emulsificada no adjuvante Alum na presença ou ausência do adjuvante QS-21 promoveram títulos semelhantes (GOZAR et al., 2001), bem como em nosso estudo.

Os isotipos de IgG predominantes na resposta induzida com os adjuvantes ACF/AIF, Quil A, QS-21 e CpG-ODN 1826 foram IgG1, IgG2a e IgG2b, caracterizando uma resposta mista Th1/Th2. Os resultados obtidos com o grupo imunizado com DII em ACF/AIF foram semelhantes aos que observamos anteriormente após imunizações com o ectodomínio de PvAMA-1 (MÚFALO et al., 2008), assim como imunizações com DI-II de PfAMA-1 (LALITHA et al., 2008). Por outro lado, no grupo imunizado na presença de Alum altos títulos de IgG1 foram detectados, caracterizando uma resposta Th2 (Figura 11). Entretanto, a adição do CpG-ODN 1826 e QS-21, potentes indutores de resposta Th1, foi capaz de balancear a resposta imune para um padrão mais equilibrado, não tão voltado para Th2 (Figura 11). De maneira semelhante, imunizações com AMA-1-C1/Alhydrogel em camundongos, ratos e porquinhos da Índia promoveram uma resposta predominantemente Th2, enquanto que imunizações com AMA-1-C1/Alhydrogel + CpG 7909 induziram a uma resposta mista Th1/Th2 (MULLEN et al., 2006).

Diversos estudos tem mostrado que o Alum pode estimular uma resposta do tipo Th2, isso implica em um grande problema para o desenvolvimento de vacinas contra doenças que são inteira ou parcialmente dependentes de resposta do tipo Th1, como por exemplo o HIV, a tuberculose e a malária (revisto por BREWER, 2006). Em situações experimentais este problema pode ser resolvido com a utilização de diferentes adjuvantes experimentais, como o adjuvante ACF/AIF, capaz de induzir resposta do tipo Th1. Entretanto a utilização deste adjuvante pode promover inflamação, endurecimento e até necrose no local da aplicação. Claramente, a falta de um adjuvante clinicamente aplicável, capaz de induzir uma resposta do tipo Th1, representa um obstáculo significativo a aplicação efetiva de vacinas contra essas doenças (revisto por BREWER, 2006). Uma possível solução é a constituição de sistemas de adjuvantes capazes de promover o balanceamento de uma resposta conforme desejado, como por exemplo os sistemas utilizados no presente estudo, Alum + CpG-ODN ou Alum + QS-21.

Estudos anteriores demonstraram em modelos experimentais que a proteína AMA-1 nativa ou recombinante de outras espécies de *Plasmodium* (*P. knowlesi*, *P. fragile*, *P. chabaudi*, *P. yoelii* e *P. falciparum*) é imunogênica e pode induzir resposta imune protetora contra infecções experimentais (revisto por REMARQUE et al., 2008). A imunidade gerada nos animais imunizados é avaliada pela detecção de



anticorpos específicos por ELISA ou IFA, e por ensaios de inibição do crescimento do parasita *in vitro*, embora nenhuma correlação com proteção *in vivo* tenha sido estabelecida até o presente momento. Imunizações com dois variantes alélicos indianos de DI-II de PfAMA-1, na presença do adjuvante de Freund, promoveram em camundongos altos títulos de IgG1, IgG2a e IgG2b, e baixos títulos de IgG3 (LALITHA et al., 2008), de forma semelhante ao observado neste trabalho para a maioria dos diferentes adjuvantes testados. Além disso, nesse estudo, anticorpos de coelhos imunizados com DI-II de PfAMA-1 foram capazes de inibir o crescimento de parasitas e a invasão de eritrócitos *in vitro* (LALITHA et al., 2008). Em outro estudo, uma proteína quimérica, expressa em levedura, contendo o DIII de PfAMA-1 e o fragmento de 19 KDa da MSP-1 de *P. falciparum*, foi altamente imunogênica após imunizações de camundongos e macacos. Além disso, induziu altos títulos de anticorpos, capazes de inibir o crescimento *in vitro* de duas diferentes linhagens de *P. falciparum* (PAN et al., 2004). Tais resultados mostram que uma vacina de subunidade é capaz de gerar anticorpos funcionais contra o parasita.

No caso específico do *P. vivax*, não dispomos ainda de um ensaio funcional *in vitro* para avaliar a eficiência dos anticorpos induzidos pela imunização com proteínas recombinantes. Recentemente, estabelecemos em nosso laboratório um ensaio de ligação de células transfectadas com os domínios I e II de PvAMA-1 (BARBEDO, 2008). É nosso intuito, avaliar a capacidade dos anticorpos policlonais gerados no presente trabalho em inibir essa ligação. O principal problema é que a eficiência da transfecção que obtivemos é muito baixa, por isso estamos trabalhando para melhorar as condições do ensaio para posteriormente avaliar a funcionalidade dos anticorpos anti-DII. Neste sentido, a fim de aprofundar os estudos de ligação/inibição da ligação de células transfectadas com PvAMA-1, previamente geramos cinco anticorpos monoclonais contra DII. Esses anticorpos foram caracterizados como sendo do isotipo IgG2b (dados não mostrados) e reconhecem epítomos independentes da conformação, pois detectaram a proteína DII por immunoblotting tanto em condições redutoras (na presença de 2-ME), como em condições não redutoras (Figura 12). Os epítomos reconhecidos por cada um dos cinco anticorpos monoclonais também estão expostos nas proteínas recombinantes DI-DII, DII-III e no ectodomínio inteiro, como detectado por ELISA (Figura 13). Assim esses anticorpos constituem-se em uma excelente ferramenta para futuros estudos

funcionais com a proteína PvAMA-1. Uma outra informação importante de nosso estudo é o fato de os soros dos camundongos imunizados com DII (policlonais e monoclonais) serem capazes de reconhecer o parasita (merozoítas livres) por imunofluorescência indireta (Figura 14). Assim, não só os epítomos são preservados na proteína recombinante, como eles são capazes de gerar anticorpos em camundongos que reconhecem os mesmos epítomos presentes em isolados naturais do parasita.

Apesar de alguns estudos mostrarem que anticorpos induzidos pela imunização com proteínas recombinantes baseadas no ectodomínio de AMA-1 de *P. chabaudi* (CREWETHER et al., 1996; ANDERS et al., 1998) e *P. yoelii* (NARUM et al., 2000) serem suficientes para conferir proteção, outros estudos mostram que a resposta imune celular também pode contribuir (XU et al., 2000; BURNS et al., 2004). No presente estudo, fizemos diversas tentativas no sentido de caracterizar a resposta imune celular dos camundongos imunizados com DII. Entretanto, observamos que tanto células esplênicas de animais não imunizados (*naives*), como os imunizados em ACF/AIF, na presença ou ausência do antígeno DII, foram capazes de produzir IFN- $\gamma$  quando reestimuladas *in vitro* com o antígeno DII (dados não mostrados). Esses resultados foram confirmados utilizando-se uma segunda linhagem de camundongos (C57BL/6). Estes achados foram inesperados e devem ser explorados no futuro com mais detalhes já que podem ter implicação para o desenvolvimento de vacinas recombinantes. Uma possível explicação para isso seria a possibilidade de que a própria proteína (PvAMA-1) tenha capacidade de ativar diretamente células produtoras de IFN- $\gamma$ . Essa hipótese é fundamentada por resultados obtidos após o reestímulo de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos, infectados ou não com malária *vivax*, com PvAMA-1, o qual foi capaz de induzir a produção de IFN- $\gamma$  (BUENO et al., 2008, 2009). Como PvAMA-1 teve um efeito direto na imunidade inata levando a produção de IFN- $\gamma$  em indivíduos não infectados (BUENO et al., 2008), é possível que os níveis detectados desta citocina em nossos experimentos, seja uma consequência da resposta imune inata dos animais testados. Entretanto, experimentos adicionais estão em andamento para confirmar essa hipótese.

Uma vez que o adjuvante é um componente imprescindível em vacinas de composição protéica, várias formulações com AMA-1 têm sido testadas em

camundongos e macacos: saponinas, Montanide ISA-720, ASO2, Quil A, Alum, além do ACF/AIF. Esses estudos serviram de base para os testes clínicos com AMA-1 de *P. falciparum* em andamento ou já concluídos.

Estudos clínicos em regiões não endêmicas com a proteína recombinante PfAMA-1 (3D7) expressa em *E. coli* na presença do adjuvante Montanide ISA720 mostraram resultados desapontadores em que apenas um indivíduo dos imunizados apresentou altos títulos de anticorpos específicos (SAUL et al., 2005), no entanto, imunizações com a mesma proteína em indivíduos de área endêmica e não endêmica, na presença de AS02A, foram capazes de induzir altos títulos de anticorpos específicos (THERA et al., 2008), de reconhecer esporozoítas e merozoítas por IFA e de promover inibição de crescimento *in vitro* de parasitas homólogos (POLHEMUS et al., 2007). Em estudo comparativo, indivíduos não imunes foram imunizados com a mesma proteína na presença de AS02A e AS01B, ambas as formulações foram altamente imunogênicas, porém todos os indivíduos apresentaram parasitemia após desafio com mosquitos infectados por parasitas homólogos. No entanto, uma leve diminuição, porém significativa, na parasitemia dos indivíduos imunizados com a formulação AMA-1/AS02A foi observada (SPRING et al., 2009).

Outros estudos clínicos foram realizados com a proteína recombinante AMA-1-C1 expressa em *Pichia pastoris*, adsorvida no adjuvante Alhydrogel. Em indivíduos de área não endêmica, altos títulos de anticorpos IgG foram observados, sendo a maioria IgG1, capazes de reconhecer o AMA-1 das duas linhagens FVO e 3D7 de maneira semelhante (MALKIN et al., 2005). Além disso, esses anticorpos foram capazes de inibir o crescimento de parasitas homólogos *in vitro* (MALKIN et al., 2005). Em estudo semelhante, Mullen e colaboradores (2006) avaliaram a mesma formulação na ausência e na presença de CpG-ODN 7909. A adição de CpG-ODN promoveu um significativo aumento de inibição de crescimento de parasitas homólogos (MULLEN et al., 2006). Tais estudos evidenciam a necessidade da escolha de um bom adjuvante para uma determinada resposta desejada, bem como o antígeno, devido sua alelo-especificidade, independente do sistema de expressão utilizado.

Ao contrário dos avanços obtidos com relação a imunogenicidade e eficácia protetora de formulações baseadas em proteínas recombinantes de AMA-1 de *P.*

*falciparum*, muito pouco se sabe sobre a imunogenicidade de AMA-1 de *P. vivax*. Até o presente momento, existem apenas três estudos pré-clínicos com PvAMA-1. Imunizações com uma proteína recombinante produzida na levedura *Pichia pastoris* e emulsificada no adjuvante SBA02 foram capazes de induzir altos títulos de anticorpos em macacos da espécie *Macaca mulatta* (KOCKEN et al., 1999). Após o desafio heterólogo com formas sanguíneas de *P. cynomolgi*, todos os macacos desenvolveram parasitemia, mas uma pequena redução da parasitemia foi observada no grupo vacinado. Um segundo estudo mostrou que a imunização com DNA plasmidial contendo o gene *Pvama-1* foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos em camundongos, os quais foram capazes de reconhecer a proteína nativa por IFA (ROGERS; GOWDA; HOFFMAN, 1999). O nosso grupo mostrou que uma proteína recombinante produzida em bactérias e emulsificada em ACF/AIF foi imunogênica em camundongos (MÚFALO et al., 2008). É nosso intuito dar continuidade as imunizações pré-clínicas em camundongos e primatas não humanos utilizando a proteína recombinante DII. A imunogenicidade desta proteína será comparada a de uma nova proteína recombinante baseada no ectodomínio sintético (códon otimizado) de PvAMA-1, expressa na levedura *Pichia pastoris*, recentemente gerada pelo nosso grupo (VICENTIN et al., 2009).

Finalmente, os resultados apresentados nesta dissertação abrem novas perspectivas de testes de formulações vacinais contra malária *vivax*. Entretanto, a questão da falta de um modelo experimental, ainda é um desafio a ser superado. Temos como metas implementar, a médio prazo, padrão da qualidade na obtenção das proteínas recombinantes, produzindo lotes-piloto dentro das normas regulatórias de BPL e BPF para futuros testes pré-clínicos e clínicos de fase I.

## **VI. CONCLUSÕES**

---

1. Nossos resultados demonstram que a proteína recombinante baseada no domínio II de PvAMA-1 foi altamente imunogênica em camundongos BALB/c quando administrada na presença dos diferentes adjuvantes testados. Altos títulos de IgG1, IgG2a e IgG2b foram observados na maioria dos grupos, sugerindo uma resposta mista Th1/Th2.
2. Anticorpos monoclonais de camundongos, previamente gerados contra o domínio II, reconhecem epítomos independentes da conformação da proteína, os quais estão expostos também em outras proteínas baseadas em PvAMA-1 (DI-II, DII-III e E);
3. Anticorpos induzidos em camundongos pela imunização com DII (policlonais e monoclonais) foram capazes de reconhecer a proteína exposta em isolados naturais de *P. vivax*, sugerindo que estes mesmos epítomos estão preservados na proteína recombinante;
4. Em conjunto, nossos resultados sugerem que algumas combinações antígeno-adjuvante testadas aqui são consideradas promissoras para futuros testes pré-clínicos em primatas não humanos.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

ALEXANDER, D. L.; MITAL, J.; WARD, G. E.; BRADLEY, P.; BOOTHROYD, J. C. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathog.** v.1, n.2, p. e17, 2005.

ALEXANDER, D. L.; ARASTU-KAPUR, S.; DUBREMETZ, J. F.; BOOTHROYD, J. C. *Plasmodium falciparum* AMA1 binds a rhoptry neck protein homologous to TgRON4, a component of the moving junction in *Toxoplasma gondii*. **Eukaryot Cell.** v. 5, n. 7, p. 1169-73, 2006.

ALONSO, P. L., SACARLAL, J., APONTE, J. J., LEACH, A., MACETE, E., MILMAN, J., MANDOMANDO, I., SPIESSENS, B., GUINOVART, C., ESPASA, M., BASSAT, Q., AIDE, P., OFORI-ANYINAM, O., NAVIA, M. M., CORACHAN, S., CEUPPENS, M., DUBOIS, M. C., DEMOITIÉ, M. A., DUBOVSKY, F., MENÉNDEZ, C., TORNIEPORTH, N., BALLOU, W. R., THOMPSON, R., COHEN, J. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. **Lancet.** v. 364, n. 9443, p.1411-20, 2004.

ALONSO, P. L., SACARLAL, J., APONTE, J. J., LEACH, A., MACETE, E., AIDE, P., SIGAUQUE, B., MILMAN, J., MANDOMANDO, I., BASSAT, Q., GUINOVART, C., ESPASA, M., CORACHAN, S., LIEVENS, M., NAVIA, M. M., DUBOIS, M. C., MENENDEZ, C., DUBOVSKY, F., COHEN, J., THOMPSON, R., BALLOU, W. R. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. **Lancet.** v.366, n. 9502, p. 2012-8, 2005.

ALONSO, P. L. Malaria: deploying a candidate vaccine (RTS,S/AS02A) for an old scourge of humankind. **Int. Microbiol.** v. 9, n. 2, p. 83-93, 2006.

AMANTE, F. H.; CREWETHER, P. E.; ANDERS, R. F.; GOOD, M. F. A cryptic T cell epitope on the apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* adami can prime for an anamnestic antibody response: implications for malaria vaccine design. **J. Immunol.** v. 159, n.11, p. 5535-44, 1997.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MÉNARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nat. Med.** v. 12, n. 2, p. 220-4, 2006.



ANDERS, R. F.; CREWETHER, P. E.; EDWARDS, S.; MARGETTS, M.; MATTHEW, M. L.; POLLOCK, B.; PYE, D. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. **Vaccine**. v.16, n. 2-3, p. 240-7, 1998.

APONTE, J. J., AIDE, P., RENOM, M., MANDOMANDO, I., BASSAT, Q., SACARLAL, J., MANACA, M. N., LAFUENTE, S., BARBOSA, A., LEACH, A., LIEVENS, M., VEKEMANS, J., SIGAUQUE, B., DUBOIS, M. C., DEMOITIÉ, M. A., SILLMAN, M., SAVARESE, B., MCNEIL, J. G., MACETE, E., BALLOU, W. R., COHEN, J., ALONSO, P. L. Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomised controlled phase I/IIb trial. **Lancet**. v. 370, p.1543–1551, 2007.

ARÉVALO-HERRERA, M.; HERRERA, S. *Plasmodium vivax* malaria vaccine development. **Mol. Immunol.** v. 38, n. 6, p. 443–55, 2001.

BAIRD, J. K. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends Parasitol.** v. 23, n. 11, p. 533-9, 2007.

BARBEDO, M. B. Expressão do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA -1) de *Plasmodium vivax* na superfície de células COS-7 transfectadas para uso em estudos funcionais. **Dissertação (Mestrado em Farmácia – Área: Análises Clínicas)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2008.

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

BARGIERI, D. Y.; ROSA, D. S.; BRAGA, C. J.; CARVALHO, B. O.; COSTA, F. T.; ESPÍNDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; SOARES, I. S.; FERREIRA, L. C.; RODRIGUES, M. M. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella typhimurium* flagellin. **Vaccine**. n. 26, n. 48, p. 6132-42, 2008.

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

BERHANU, A., WILSON, R. L., KIRKWOOD-WATTS, D. L., KING, D. S., WARREN, T. K., LUND, S. A., BROWN, L. L., KRUPKIN, A. K., VANDERMAY, E., WEIMERS, W., HONEYCHURCH, K. M., GROSENBACH, D. W., JONES, K. F., HRUBY, D. E. Vaccination of BALB/c mice with *Escherichia coli*-expressed vaccinia virus proteins A27L, B5R, and D8L protects mice from lethal vaccinia virus challenge. **J. Virol.** v.82, n. 7, p. 3517-29, 2008.

BESSON, J. G.; OSIER, F. H.A.; ENGWERDA, C. R. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. **Trends Parasitol.** v. 24, n. 12, p. 578-84, 2008.

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

BUENO, L. L., MORAIS, C. G., SOARES, I. S., BOUILLET, L. E., BRUNAROMERO, O., FONTES, C. J., FUJIWARA, R. T., BRAGA, E. M. Plasmodium vivax recombinant vaccine candidate AMA-1 plays an important role in adaptive immune response eliciting differentiation of dendritic cells. **Vaccine.** v. 27, n. 41, p. 5581-8, 2009.

BURNS, J. M. Jr.; FLAHERTY, P. R.; NANAVATI, P.; WEIDANZ, W. P. Protection against *Plasmodium chabaudi* malaria induced by immunization with apical membrane antigen 1 and merozoite surface protein 1 in the absence of gamma interferon or interleukin-4. **Infect. Immun.** v. 72, n. 10, p. 5605-12, 2004.

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

CAVINATO, R. A.; BASTOS, K. R.; SARDINHA, L. R.; ELIAS, R. M.; ALVAREZ, J. M.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R. Susceptibility of the different developmental stages of the asexual (schizogonic) erythrocyte cycle of *Plasmodium chabaudi* chabaudi to hyperimmune serum, immunoglobulin (Ig)G1, IgG2a and F(ab')2 fragments. **Parasite Immunol.** v. 23, n. 11, p. 587-97, 2001.

CHESNE-SECK, M. L.; PIZARRO, J. C.; VULLIEZ-LENORMAND, B.; COLLINS, C. R.; BLACKMAN, M. J.; FABER, B. W.; REMARQUE, E. J.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BENTLEY, G. A. Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.144, n. 1, p. 55-67, 2005.

COELHO, J. S., SOARES, I. S., LEMOS, E. A., JIMENEZ, M. C., KUDÓ, M. E., MORAES, S. L., FERREIRA, A. W., SANCHEZ, M. C. A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous detection of malaria, Chagas disease, and syphilis-specific IgG antibodies. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 58, n. 2, p. 223-30, 2007.

COLLINS, W. E.; PYE, D.; CREWETHER, P. E.; VANDENBERG, K. L.; GALLAND, G. G.; SULZER, A. J.; KEMP, D. J.; EDWARDS, S. J.; COPPEL, R. L.; SULLIVAN, J. S.; MORRIS, C. L.; ANDERS, D. F. Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of *Plasmodium fragile*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 51, n. 6, p. 711-9, 1994.

COLLINS, C. R.; WITHERS-MARTINEZ, C.; BENTLEY, G. A.; BATCHELOR, A. H.; THOMAS, A. W.; BLACKMAN, M. J. Fine mapping of an epitope recognized by an invasion-inhibitory monoclonal antibody on the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **J. Biol. Chem.** v. 282, n. 10, p. 7431-41, 2007.

COLLINS, C. R.; WITHERS-MARTINEZ, C.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M. J. An inhibitory antibody blocks interactions between components of the malarial invasion machinery. **Plos Pathog.** v. 5, n. 1, p. 1000273 e, 2009.

CREWETHER, P. E.; CULVENOR, J. G.; SILVA, A.; COOPER, J. A.; ANDERS, R. F. *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. **Exp. Parasitol.** v. 70, n. 2, p. 193 - 206, 1990.

CREWETHER, P. E.; MATTHEW, M. L.; FLEGG, R. H.; ANDERS, R. F. Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes. **Infect. Immun.** v. 64, n. 8, p. 3310-7, 1996.

CROMPTON, P. D.; MIRCETIC, M.; WEISS, G.; BAUGHMAN, A.; HUANG, C. Y.; TOPHAM, D. J.; TREANOR, J. J.; SANZ, I.; LEE, F. E.; DURBIN, A. P.; MIURA, K.; NARUM, D. L.; ELLIS, R. D.; MALKIN, E.; MULLEN, G. E.; MILLER, L. H.; MARTIN, L. B.; PIERCE, S. K. The TLR9 ligand CpG promotes the acquisition of *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in malaria-naive individuals. **J. Immunol.** v. 182, n. 5, p. 3318-26, 2009.

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, 2001.

DEANS, J. A.; KNIGHT, A. M.; JEAN, W. C.; WATERS, A. P.; COHEN, S.; MITCHELL, G. H. Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor, invariant, *Plasmodium knowlesi* 66 kD merozoite antigen. **Parasite Immunol.** v.10, n. 5, p. 535-52, 1988.

DICKO, A.; DIEMERT, D. J.; SAGARA, I.; SOGOBA, M.; NIAMBELE, M. B.; ASSADOU, M. H.; GUINDO, O.; KAMATE, B.; BABY, M.; SISSOKO, M.; MALKIN, E. M.; FAY, M. P.; THERA, M. A.; MIURA, K.; DOLO, A.; DIALLO, D. A.; MULLEN, G.; LONG, C. A.; SAUL, A.; DOUMBO, O.; MILLER, L. H. Impact of a *Plasmodium falciparum* AMA1 vaccine on antibody responses in adult Malians. **PLoS ONE**. v. 2, n. 10, p. 1045 e, 2007.

DICKO, A.; SAGARA, I.; ELLIS, R. D.; MIURA, K.; GUINDO, O.; KAMATE, B.; SOGOBA, M.; NIAMBELÉ, M. B.; SISSOKO, M.; BABY, M.; DOLO, A.; MULLEN, G. E.; FAY, M. P.; PIERCE, M.; DIALLO, D. A.; SAUL, A.; MILLER, L. H.; DOUMBO, O. K.; Phase 1 study of a combination AMA1 blood stage malaria vaccine in Malian children. **PLoS ONE**. v. 3, n. 2, p. 1563 e, 2008.

DITTMER, U.; OLBRICH, A. R. Treatment of infectious diseases with immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 6, n. 5, p. 472-7, 2003.

DUTTA, S.; LALITHA, P. V.; WARE, L. A.; BARBOSA, A.; MOCH, J. K.; VASSELL, M. A.; FILETA, B. B.; KITOV, S.; KOLODNY, N.; HEPNER, D. G.; HAYNES, J. D.; LANAR, D. E. Purification, characterization, and immunogenicity of the refolded ectodomain of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 expressed in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** v. 70, n. 6, p. 3101-10, 2002.

DUTTA, S.; HAYNES, J. D.; BARBOSA, A.; WARE, L. A.; SNAVELY, J. D.; MOCH, J. K.; THOMAS, A. W.; LANAR, D. E. Mode of action of invasion-inhibitory antibodies directed against apical membrane antigen 1 of *Plasmodium falciparum*. **Infect. Immun.** v. 73, n. 4, p. 2116-22, 2005.

FENG, Z. P.; KEIZER, D. W.; STEVENSON, R. A.; YAO, S.; BABON, J. J.; MURPHY, V. J.; ANDERS, R. F.; NORTON, R. S. Structure and inter-domain interactions of domain II from the blood-stage malarial protein, apical membrane antigen 1. **J. Mol. Biol.** v. 350, n. 4, p. 641- 56, 2005.

FRASER, T. S.; KAPEE, S. H.; NARUM, D. I.; VANBUSKIRK, K. M.; ADAMS, J. H. Erythrocyte-binding activity of *Plasmodium yoelii* apical membrane antigen-1 expressed on the surface of transfected COS-7 cells. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 117, n. 1, p. 49-59, 2001.

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

GARRAUD, O.; PERRAUT, R.; RIVEAU, G.; NUTMAN, T.B. Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses. **Trends Parasitol.** v.19, n. 7, p. 300-4, 2003.

GENTON, B., D'ACREMONT, V., RARE, L., BAEA, K., REEDER, J. C., ALPERS, M. P., MÜLLER, I. *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. **PLoS Med.** v. 5, n. 6, p. e127, 2008.

GOOD, M. F.; STANISIC, D.; XU, H.; ELLIOTT, S.; WYKES, M. The immunological challenge to developing a vaccine to the blood stages of malaria parasites. **Immunol. Rev.** v. 201, p. 254-67, 2005.

GOZAR, M. M., MURATOVA, O., KEISTER, D. B., KENSIL, C. R., PRICE, V. L., KASLOW, D. C. *Plasmodium falciparum*: immunogenicity of alum-adsorbed clinical-grade TBV25-28, a yeast-secreted malaria transmission-blocking vaccine candidate. **Exp. Parasitol.** v. 97, n. 2, p. 61-9, 2001.

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

GUNASEKERA, A. M., WICKRAMARACHCHI, T., NEAFSEY, D. E., GANGULI, I., PERERA, L., PREMARATNE, P. H., HARTL, D., HANDUNNETTI, S. M., UDAGAMA-RANDENIYA, P. V., WIRTH, D. F. Genetic diversity and selection at the *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1) locus in a Sri Lankan population. **Mol. Biol. Evol.** v. 24, n. 4, p.939-47, 2007.

HAÇARIZ, O., SAYERS, G., MCCULLOUGH, M., GARRETT, M., O'DONOVAN, J., MULCAHY, G. The effect of Quil A adjuvant on the course of experimental *Fasciola hepatica* infection in sheep. **Vaccine.** v. 27, n. 1, p. 45-50. 2009.

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

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

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

HIGGS, E. S.; SINA, B. *Plasmodium vivax* vaccine research: steps in the right direction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 73, n. 5 Suppl, p. 1-2, 2005.

HODDER, A. N.; CREWETHER, P. E.; ANDERS, R. E. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1. **Infect. Immune.** v. 69, n. 5, p. 3286-94, 2001.

HOWELL, S. A.; WITHERS-MARTINEZ, C.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BLACKMAN, M. J. Proteolytic processing and primary structure of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen-1. **J. Biol. Chem.** v. 276, n. 3, p. 31311-20, 2001.

HOWELL, S. A.; WELL, I.; FLECK, S. L.; KETTLEBOROUGH, C.; COLLINS, C. R.; BLACKMAN, M. J. A single malaria merozoite serine protease mediated shedding of multiple surface proteins by juxtamembrane cleavage. **J. Biol. Chem.** v. 278, n. 26, p. 23890 - 8, 2003.

KARUNAWERA, N. D.; WIJESEKERA, S. K.; WANASEKERA, D.; MENDIS, K. N.; CARTER, R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. **Trends Parasitol.** v. 19, n. 4, p. 188-93. 2003.

KATO, K.; MAYER, D. C.; SINGH, S.; REID, M.; MILLER, L. H. Domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 102, n. 15, p. 5552-7, 2005.

KENNEDY, M. C.; WANG, J.; ZHANG, Y.; MILES, A. P.; CHITSAZ, F.; SAUL, A.; LONG, C. A.; MILLER, L. H.; STOWERS, A. W. In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. **Infect. Immun.** v. 70, n.12, p. 6948-60, 2002.

KENNEY, R. T., EDELMAN, R. Survey of human-use adjuvants. **Expert Rev. Vaccines.** v. 2, n.2, p. 167-88, 2003.

KOCHAR, D. K., DAS, A., KOCHAR, S. K., SAXENA, V., SIROHI, P., GARG, S., KOCHAR, A., KHATRI, M. P., GUPTA, V. Severe *Plasmodium vivax* malaria: a report on serial cases from Bikaner in northwestern India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 80, n. 2, p.194-8, 2009.

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

KOCKEN, C. H.; WITHERS-MARTINEZ, C.; DUBBELD, M. A.; VAN DER WEL, A.; HACKETT, F.; VALDERRAMA, A.; BLACKMAN, M. J.; THOMAS, A. W. High-level expression of the malaria blood-stage vaccine candidate *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 and induction of antibodies that inhibit erythrocyte invasion. **Infect. Immun.** v. 70, n. 10, p. 5901, 2002.

KRISTOFF, J. Malaria stage-specific vaccine candidates. **Curr. Pharm. Des.** v. 13, n. 19, p. 1989-99, 2007.

KUMAR, S., JONES, T. R., OAKLEY, M. S., ZHENG, H., KUPPUSAMY, S. P., TAYE, A., KRIEG, A. M., STOWERS, A. W., KASLOW, D. C., HOFFMAN, S. L. CpG oligodeoxynucleotide and Montanide ISA 51 adjuvant combination enhanced the protective efficacy of a subunit malaria vaccine. **Infect. Immun.** v. 72, n. 2, p. 949-57, 2004.

LALITHA, P. V.; WARE, L. A.; BARBOSA, A.; DUTTA, S.; MOCH, J. K.; HAYNES, J. D.; FILETA, B. B.; WHITE, C. E.; LANAR, D. E. Production of the subdomains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 ectodomain and analysis of the immune response. **Infect. Immun.** v. 72, n. 8, p. 4464-70, 2004.

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

LEENAARS, P. P., HENDRIKSEN, C. F., ANGULO, A. F., KOEDAM, M. A., CLAASSEN, E. Evaluation of several adjuvants as alternatives to the use of Freund's adjuvant in rabbits. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 40, n. 3, p.225-41, 1994.

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

MAHER, B. Malaria vaccine gets shot in the arm from tests. **Nature**. v. 456, n. 7223, p. 680-1, 2008.

MALKIN, E. M.; DIEMERT, D. J.; MCARTHUR, J. H.; PERREAULT, J. R.; MILES, A. P.; GIERSING, B. K.; MULLEN, G. E.; ORCUTT, A.; MURATOVA, O.; AWKAL, M.; ZHOU, H.; WANG, J.; STOWERS, A.; LONG, C. A.; MAHANTY, S.; MILLER, L. H.; SAUL, A.; DURBIN, A. P. Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. **Infect. Immun.** v. 73, n. 6, p. 3677-85, 2005.

MEIS, J. F.; VERHAVE, J. P.; JAP, P. H.; SINDEN, R. E.; MEUWISSEN, J. H. Ultrastructural observations on the infection of rat liver by *Plasmodium berghei* sporozoites *in vivo*. **J. Protozool.** v. 30, n. 2, p. 361-6, 1983.

MITAL, J.; MEISSNER, M.; SOLDATI, D.; WARD, G. E. Conditional expression of *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. **Mol. Biol. Cell.** v. 16, n. 9, p. 4341-9, 2005.

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

MORAIS, C. G., SOARES, I. S., CARVALHO, L. H., FONTES, C. J., KRETTLI, A. U., BRAGA, E. M. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. **Parasitol. Res.** v.95, n. 6, p. 420-6, 2005.



MORAIS, C. G., SOARES, I. S., CARVALHO, L. H., FONTES, C. J., KRETTLI, A. U., BRAGA, E. M. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.75, n. 4, p. 582-7, 2006.

MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells by apicomplexan parasites. **Microbes Infect.** v. 3, n. 13, p.1123-8, 2001.

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

MÚFALO, B. C.; GENTIL, F.; BARGIERI, D. Y.; COSTA, F. T.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes Infect.** v. 10, n. 12-13, p.1266-73, 2008.

MULLEN, G. E., GIERSING, B. K., AJOSE-POPOOLA, O., DAVIS, H. L., KOTHE, C., ZHOU, H., AEBIG, J., DOBRESCU, G., SAUL, A., LONG, C. A. Enhancement of functional antibody responses to AMA1-C1/Alhydrogel, a *Plasmodium falciparum* malaria vaccine, with CpG oligodeoxynucleotide. **Vaccine.** v. 24, n. 14, p.:2497-505, 2006.

NARUM, D. L.; OGUN, S. A.; THOMAS, A. W.; HOLDER, A. A. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal *Plasmodium yoelii yoelii* YM blood-stage infection. **Infect. Immun.** v. 68, n. 5, p. 2899-906, 2000.

OLIVEIRA-FREITAS, E.; CASAS, C. P.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; NICO, D.; SOUZA, L. O.; TINOCO, L. W.; DA SILVA, B. P.; PALATNIK, M.; PARENTE, J. P.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Acylated and deacylated saponins of *Quillaja saponaria* mixture as adjuvants for the FML-vaccine against visceral leishmaniasis. **Vaccine.** v. 24, n. 18, p. 3909-20, 2006.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE 2008. (<http://www.jaircorp.wordpress.com/2008/01/09/malaria/>), (Acessado em setembro de 2008).

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, WORLD MALARIA REPORT, (<http://www.rbm.who.int/wmr2005/html/1-1.htm>), (Acessado em março de 2009).

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE Portfolio of candidates malaria vaccines currently in development (<http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/pathologys/id/2005/LarussaMalariaTable.pdf>), (Acessado em março de 2009).

PAN, W., HUANG, D., ZHANG, Q., QU, L., ZHANG, D., ZHANG, X., XUE, X., QIAN, F. Fusion of two malaria vaccine candidate antigens enhances product yield, immunogenicity, and antibody-mediated inhibition of parasite growth in vitro. **J. Immunol.** v. 172, n. 10, p. 6167-74, 2004.

PAIN, A; HERTZ-FOWLER, C. *Plasmodium* genomics: latest milestone. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 7, n. 3, p. 180-1, 2009.

PIZARRO, J. C.; VULLIEZ-LE NORMAND. B.; CHESNE-SECK, M. L.; COLLINS, C. R.; WITHERS-MARTINEZ, C.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M. J.; FABER, B. W.; REMARQUE, E. J.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; BENTLEY, G. A. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science.** v. 308, n. 5720, p. 408-11, 2005.

POLHEMUS, M. E.; MAGILL, A. J.; CUMMINGS, J. F.; KESTER, K. E.; OCKENHOUSE, C. F.; LANAR, D. E.; DUTTA, S.; BARBOSA, A.; SOISSON, L.; DIGGS, C. L.; ROBINSON, S. A.; HAYNES, J. D.; STEWART, V. A.; WARE, L. A.; BRANDO, C.; KRZYCH, U.; BOWDEN, R. A.; COHEN, J. D.; DUBOIS, M. C.; OFORI-ANYINAM, O.; DE-KOCK, E.; BALLOU, W. R.; HEPPNER, D. G. JR. Phase I dose escalation safety and immunogenicity trial of *Plasmodium falciparum* apical membrane protein (AMA-1) FMP2.1, adjuvanted with AS02A, in malaria-naïve adults at the Walter Reed Army Institute of Research. **Vaccine.** v. 25, n. 21, p. 4203-12, 2007.

POLHEMUS, M. E., REMICH, S. A., OGUTU, B. R., WAITUMBI, J. N., OTIENO, L., APOLLO, S., CUMMINGS, J. F., KESTER, K. E., OCKENHOUSE, C. F., STEWART, A., OFORI-ANYINAM, O., RAMBOER, I., CAHILL, C. P., LIEVENS, M., DUBOIS, M. C., DEMOITIE, M. A., LEACH, A., COHEN, J., BALLOU, R. W., HEPPNER, G.D. 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, 2009.

POMBO, D. J.; LAWRENCE, G.; HIRUNPETCHARAT, C.; RZEPCZYK, C.; BRYDEN, M.; CLOONAN, N.; ANDERSON, K.; MAHAKUNKIJCHAROEN, Y.; MARTIN, L. B.; WILSON, D.; ELLIOTT, S.; ELLIOTT, S.; EISEN, D. P.; WEINBERG, J. B.; SAUL, A.; GOOD, M. F. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. **Lancet.** v. 360, n. 9333, p. 610-7, 2002.

POLLEY, S. D., CONWAY, D. J. Strong diversifying selection on domains of the *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 gene. **Genetics**. v. 158, n. 4, p. 1505-12, 2001.

POLLEY, S. D., CHOKEJINDACHAI, W., CONWAY, D. J. Allele frequency-based analyses robustly map sequence sites under balancing selection in a malaria vaccine candidate antigen. **Genetics**. v. 165, n. 2, p. 555-61, 2003.

PRICE, R. N.; TJITRA, E.; GUERRA, C. A.; YEUNG, S.; WHITE, N. J.; ANSTEY, N. M. *Vivax* malaria: neglected and not benign. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 77, n.6 Suppl, p. 79-87,2007.

PUTAPORNTIP, C., JONGWUTIWES, S., TIA, T., FERREIRA, M. U., KANBARA, H., TANABE, K. Diversity in the thrombospondin-related adhesive protein gene (TRAP) of *Plasmodium vivax*. **Gene**. v. 268, n.1-2, p. 97-104, 2001.

QIAN, F., RAUSCH, K. M., MURATOVA, O., ZHOU, H., SONG, G., DIOUF, A., LAMBERT, L., NARUM, D. L., WU, Y., SAUL, A., MILLER, L. H., LONG, C. A., MULLEN, G. E. Addition of CpG ODN to recombinant *Pseudomonas aeruginosa* ExoProtein A conjugates of AMA1 and Pfs25 greatly increases the number of responders. **Vaccine**. v. 26, n. 20, p. 2521-7, 2008.

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

REMARQUE, E. J.; FABER, B. W.; KOCKEN, C. H. M.; THOMAS, A. W. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends Parasitol.** v.24, n. 2, p. 74-84, 2008.

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

RODRIGUES, M. H. C.; RODRIGUES, K. M.; OLIVEIRA, T. R.; CÔMODO, A. N.; RODRIGUES, M. M.; KOCKEN, C.H.; THOMAS, A. W.; SOARES, I. S. Antibody immune response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen-1. **Int. J. Parasitol.** v. 35, n. 2, p.185-92, 2005.

ROGERS, W. O., GOWDA, K., HOFFMAN, S. L. Construction and immunogenicity of DNA vaccine plasmids encoding four *Plasmodium vivax* candidate vaccine antigens. **Vaccine**. v.17, n. 23-24, p. 3136-44, 1999.

ROSA, D. S.; TZELEPIS, F.; CUNHA, M. G.; SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. **Immunol. Lett.** v. 92, n. 3, p. 259-68, 2004.

ROSA, D. S., IWAI, L. K., TZELEPIS, F., BARGIERI, D. Y., MEDEIROS, M. A., SOARES, I. S., SIDNEY, J., SETTE, A., KALIL, J., MELLO, L. E., CUNHA-NETO, E., RODRIGUES, M. M. Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). **Microbes Infect.** v.8, n. 8, p.2130-7, 2006.

ROTMAN, H. L.; DALY, T. M.; CLYNES, R.; LONG, C. A. Fc receptors are not required for antibody mediate protection against lethal malaria challenge in a mouse model. **J. Immunol.** v.161, n. 4, p.1908-12, 1998.

SABCHAREON, A., BURNOUF, T., OUATTARA, D., ATTANATH, P., BOUHAROUN-TAYOUN, H., CHANTAVANICH, P., FOUCAULT, C., CHONGSUPHAJAISIDDHI, T., DRUILHE, P. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in *falciparum* malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 45, n. 3, p. 297-308, 1991.

SAUL, A.; LAWRENCE, G.; ALLWORTH, A.; ELLIOTT, S.; ANDERSON, K.; RZEPCHYK, C.; MARTIN, L. B.; TAYLOR, D.; EISEN, D. P.; IRVING, D. O.; PYE, D.; CREWETHER, P. E.; HODDER, A. N.; MURPHY, V. J.; ANDERS, R. F. A human phase 1 vaccine clinical trial of the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1 in Montanide ISA720 adjuvant. **Vaccine**. v. 23, n.23, p. 3076-83, 2005.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2008. Disponível em <<http://dtr2008.saude.gov.br/svs>>. Acesso em 15 fev. 2009.

SIBLEY, C. H.; RINGWALD, P. A database of antimalarial drug resistance. **Malar. J.** v.5, p.48, 2006.

SILVIE, O.; FRANETICH, J. F.; RÉNIA, L.; MAZIER, D. Malaria sporozoite: migrating for a living **Trends Mol. Med.** v.10, n.3, p. 97-100, 2004.

SOARES, I. S.; LEVITUS, G.; SOUZA, J. M.; DEL PORTILLO, H. A.; RODRIGUES, M. M. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. **Infect. Immun.** v. 65, n. 5, p. 1606-14, 1997.

SOARES, I. S., OLIVEIRA, S. G., SOUZA, J. M., RODRIGUES, M. M. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. **Acta. Trop.** v. 72, n. 1, p. 13-24, 1999a.

SOARES, I. S.; CUNHA, M. G.; SILVA, M. N.; SOUZA, J. M.; DEL PORTILLO, H. A.; RODRIGUES, M. M. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 60, n. 3, p. 357-63, 1999b.

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. 3, p. 237-46, 2002.

SPRING, M. D.; CUMMINGS, J. F.; OCKENHOUSE, C. F.; DUTTA, S.; REIDLER, R.; ANGOV, E.; BERGMANN-LEITNER, E.; STEWART, V. A.; BITTNER, S.; JUOMPAN, L.; KORTEPETER, M. G.; NIELSEN, R.; KRZYCH, U.; TIERNEY, E.; WARE, L. A.; DOWLER, M.; HERMSEN, C. C.; SAUERWEIN, R. W.; DE VLAS, S. J.; OFORI-ANYINAM, O.; LANAR, D. E.; WILLIAMS, J. L.; KESTER, K. E.; TUCKER, K.; SHI, M.; MALKIN, E.; LONG, C.; DIGGS, C. L.; SOISSON, L.; DUBOIS, M. C.; BALLOU, W. R.; COHEN, J.; HEPPNER, D. G. JR. 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, 2009.

STEWART, M. J.; VANDERBERG, J. P. Malaria sporozoites leave behind trails of circumsporozoite protein during gliding motility. **J. Protozool.** v. 35, n. 3, p. 389-93, 1988.

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

STOWERS, A. W.; KENNEDY, M. C.; KEEGAN, B. P.; SAUL, A.; LONG, C. A.; MILLER, L. H. Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria. **Infect. Immun.** v. 70, n. 12, p. 6961-7, 2002.

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

TARUN, A. S.; BAER, k.; DUMPIT, R. F.; GRAY, S.; LEJARCEGUI, N.; FREVERT, U.; KAPPE, S. H. Quantitative isolation and *in vivo* imaging of malaria parasite liver stage. **Inst. J. Parasitol.** v. 36, n. 12, p. 1283-93, 2006.

THAKUR, A., ALAM, M. T., BORA, H., KAUR, P., SHARMA, Y. D. *Plasmodium vivax*: sequence polymorphism and effect of natural selection at apical membrane antigen 1 (PvAMA1) among Indian population. **Gene.** v. 419, n. 1-2, p. 35-42, 2008.

THERA, M. A.; DOUMBO, O. K.; COULIBALY, D.; DIALLO, D. A.; KONE, A. K.; GUINDO, A. B.; TRAORE, K.; DICKO, A.; SAGARA, I.; SISSOKO, M. S.; BABY, M.; SISSOKO, M.; DIARRA, I.; NIANGALY, A.; DOLO, A.; DAOU, M.; DIAWARA, S. I.; HEPPNER, D. G.; STEWART, V. A.; ANGOV, E.; BERGMANN-LEITNER, E. S.; LANAR, D. E.; DUTTA, S.; SOISSON, L.; DIGGS, C. L.; LEACH, A.; OWUSU, A.; DUBOIS, M. C.; COHEN, J.; NIXON, J. N.; GREGSON, A.; TAKALA, S. L.; LYKE, K. E.; PLOWE, C. V. Safety and immunogenicity of an AMA-1 malaria vaccine in Malian adults: results of a phase 1 randomized controlled trial. **PLoS One.** v. 3, n. 1, p. e1465, 2008.

THOMAS, A. W., DEANS, J. A., MITCHELL, G. H., ALDERSON, T., COHEN, S. The Fab fragments of monoclonal IgG to a merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 13, n. 2, p. 187-99, 1984.

TJITRA, E., ANSTEY, N. M., SUGIARTO, P., WARIKAR, N., KENANGALEM, E., KARYANA, M., LAMPAH, D. A., PRICE, R. N. Multidrug-resistant *Plasmodium vivax* associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. **PLoS Med.** v. 5, n. 6, p. e128, 2008.

TREECK, M.; ZACHERL, S.; HERRMANN, S.; CABRERA, A.; KONO, M.; STRUCK, N. S.; ENGELBERG, K.; HAASE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MIURA, K.; SPIELMANN, T.; GILBERGER, T. W. Functional analysis of the leading malaria vaccine candidate AMA-1 reveals an essential role for the cytoplasmic domain in the invasion process. **PLoS Pathog.** v. 5, n. 3, p. e1000322, 2009.

VICENTIN, E. C.; FRANÇOZO, K. S., RODRIGUES, M. M., SOARES, I. S. Generation an analysis of the immunogenicity of a recombinant protein based on the Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1) of *Plasmodium vivax* expressed in *Pichia pastoris*. In: XXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2009, Rio de Janeiro. **Abstract.** Armação dos Búzios, aug. 23; 2009. p. 240, res. IM04.

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

WATERS, A. P.; THOMAS, A. W.; DEANS, J. A.; MITCHELL, G. H.; HUDSON, D. E.; MILLER, L. H.; MCCUTCHAN, T. F.; COHEN, S. A merozoite receptor protein from *Plasmodium knowlesi* is highly conserved and distributed throughout *Plasmodium*. **J. Biol. Chem.** v. 265, n. 29, p. 17974-9, 1990.

WILSON-WELDER, J. H.; TORRES, P. M.; KIPPER, M. J.; SURYA, K; MALLAPRAGDA, M. J.; WANNEMUEHLER, B. N. Vaccine Adjuvants: Current Challenges and Future Approaches. **J. Pharm. Sci.** v. 98, n. 4, p. 1278-316, 2009.

XU, H., HODDER, A. N., YAN, H., CREWETHER, P. E., ANDERS, R. F., GOOD, M. F. CD4+ T cells acting independently of antibody contribute to protective immunity to *Plasmodium chabaudi* infection after apical membrane antigen 1 immunization. **J. Immunol.** v. 165, n. 1, p. 389-96, 2000.

ZWERGER, C., PLESKER, R., PAPADOPULOS, K., CUBETALER, K., HARTINGER, J. A comparison of commercially available adjuvants in BALB/c-mice immunised with a weekly immunogenic peptide. **ALTEX.** v.15, n. 5, p. 83-86, 1998.