

XIOMARA ALEXANDRA GAITÁN

**Caracterização da proteína MTRAP de *Plasmodium berghei* como
antígeno de bloqueio da transmissão**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências (Parasitologia).

São Paulo

2019

XIOMARA ALEXANDRA GAITÁN

Caracterização da proteína MTRAP de *Plasmodium berghei* como antígeno de bloqueio da transmissão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências (Parasitologia).

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno – Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Daniel Youssef Bargieri

Versão Corrigida

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gaitán, Xiomara Alexandra
Caracterização da proteína MTRAP de Plasmodium
berghei como antígeno de bloqueio da transmissão /
Xiomara Alexandra Gaitán; orientador Daniel
Youssef Bargieri. -- São Paulo, 2019.
103 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Malária. 2. Transmissão. 3. MTRAP. 4.
Fertilização. 5. Vacinas. I. Bargieri, Daniel
Youssef , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Xiomara Alexandra Gaitán
Título da dissertação: Caracterização da proteína MTRAP de *Plasmodium berghei*
 como antígeno de bloqueio da transmissão

Orientador: Prof. Dr. Daniel Youssef Bargieri

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública
realizada/...../, considerou

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Expressão, purificação e caracterização imunológica de proteína MTRAP de P. berghei*", registrado sob o protocolo nº **85/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **30/08/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Daniel Youssef Bargieri**

- Departamento: *Parasitologia*

- Membros da Equipe: *Xiomara Alexandra Gaitan*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www2.icb.usp.br/icb/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Expression, purification and immunological analysis of P. berghei MTRAP*", protocol nº **85/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **8/30/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Daniel Youssef Bargieri**

- Team members: *Xiomara Alexandra Gaitan*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	Balb/c	Fêmea/female	20 g	140
	C57BL/6	Fêmea/female	20 g	100

São Paulo, 05 de setembro de 2017.


Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Trabalho realizado com auxílio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), processo número 2016/16649-4

*A mis sobrinos adorados Luciana y Milan,
a mi querido hermano Dabey Alejandro, a
mis padres Luz Aleyda y Dabey, a mi viejo
querido Jacinto, por la espera.*

AGRADECIMENTOS

A minha família nas afastadas terras Chaparralunas, a meus pais Luz Aleyda Gaitán e Dabey Suarez, meu irmão Dabey Alejandro, meus sobrinhos Luciana e Milan, e meu avô Jacinto Gaitán, pelo suporte e apoio nas minhas decisões, por me animar a tomar riscos e me aventurar longe de casa.

A Daniel Y. Bargieri, por abrir as portas de seu laboratório para mim, pela oportunidade de fazer parte do time Lab 14; pela paciência e a confiança depositada para o desenvolvimento deste trabalho.

Às “vaginas do Lab 14”, Juliana Calit, Miriam, Thais, Vesselina, Irina e Marisé, pelo conhecimento aportado, pelas discussões dos resultados, pelas palavras nos momentos de experimento que não deram certo, por estar sempre dispostas a ensinar e ajudar, pelo ambiente familiar.

Às maduras, Irina e Marisé, meus amores, por fazer que cada momento com vocês vale a pena, vocês são maravilhosas.

A Rosana, Soraya e Richard, pela sua disposição para ajudar, discutir (ciência, política e vida) e pelos momentos fora das instalações do ICB.

A Mariana Ribeiro, pelo intercambio de conhecimento, pelos papos e por sua ajuda na correção deste documento.

A Juliana Ávila, por sua disposição para ajudar nas coisas do laboratório.

Aos professores do departamento de parasitologia, Ariel Silber, Gerhard Wunderlich, Mauro Cortez, Beatriz Stolf, Marta Teixeira, Cláudio Marinho, Carsten Wrenger, Alejandro Katzin, Carlos Winter, e seus estudantes, pela colaboração no uso de equipamentos e requerimento de reagentes.

À professora Sílvia Boscardin, ao Marcio e os estudantes do laboratório 46, pela colaboração e intercambio de técnicas, anticorpos e outros materiais.

Ao professor Jansen Madeiros e Maisa da Silva Araújo no laboratório de entomologia da FIOCRUZ-RO pela oportunidade de retomar o trabalho com *Anopheles*. À Alice, Najara Akira, Isabele e Rafael, os meninos mágicos da colônia de *Anopheles darlingi* por todo o suporte e apoio para o desenvolvimento dos ensaios de infecção com *P. berghei*.

A Eliana Galindo e Pablo Fontoura, por sua ajuda no começo da minha estadia em São Paulo.

A Paola Andrea Ortiz, que por sua experiência no Brasil, sempre com boa disposição me orientou e me acompanhou para resolver coisas da burocracia Brasileira. Por ser essa pessoa que pode te alegrar o dia.

Ao Dr. Gustavo Adolfo Vallejo, por me introduzir no mundo da pesquisa e me inspirar a vir ao Brasil, e seguir seus passos como cientista.

A minha família no Brasil, Leandro, Rodrigo e Raula (a quota Brasileira), Leydi, Tania, Guille e Edgar (meus Peruanos favoritos), pelos momentos de lazer e alegria, pela troca de experiências, conhecimento e pontos de vista.

Ao pessoal do Biotério do departamento de parasitologia, especialmente Daniele, Juliane e Anderson, pelo fornecimento dos animais de experimentação.

Às meninas da secretaria, Silvia, Dalva e Sabrina, por facilitar as coisas para a gente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento deste projeto. Por entender que a pesquisa faz parte fundamental no desenvolvimento da sociedade.

Ao Brasil, por me acolher como cidadão, por me permitir viver esta experiência no aproveitamento da sua cultura, gastronomia e conhecer o calor humano do povo Brasileiro.

E para você, que embora seu nome não esteja listado nestes agradecimentos, mais que também contribui de alguma forma ou outra no desenvolvimento deste projeto.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS!

RESUMO

O desenvolvimento de uma vacina contra a malária é um dos grandes desafios das ciências biomédicas nos últimos anos. O conhecimento limitado de antígenos essenciais e sua função durante o ciclo de vida do *Plasmodium*, polimorfismo antigênico e a capacidade de adaptação do parasito são as principais dificuldades para a criação de vacinas. Isto se traduz na pequena quantidade de antígenos de *Plasmodium* testados em ensaios clínicos de vacinação e no insucesso destes ensaios. Até o momento apenas um dos antígenos descritos foi testado em ensaio clínico de fase III. Recentemente identificamos um novo antígeno, MTRAP, relacionado à transmissão do parasito do hospedeiro mamífero ao mosquito vetor. As proteínas que tem uma importância nessa fase do ciclo de vida do parasito são menos polimórficas, pois estão submetidas a uma menor pressão seletiva pela resposta imunológica do hospedeiro vertebrado e podem servir como antígenos alvo para vacinas com atividade bloqueadora da transmissão do parasito. Neste trabalho, nós testamos o potencial da MTRAP de *P. berghei* de gerar anticorpos com capacidade de inibição da fertilização de gametas *in vitro*. Nós induzimos a formação de anticorpos policlonais por imunização de camundongo da linhagem BALB/c com um recombinante da *PbMTRAP* produzida em *E. coli*. A atividade bloqueadora da transmissão dos anticorpos anti-*PbMTRAP* foi testada mediante ensaios de conversão *in vitro*. A proteína recombinante *PbMTRAP* desencadeou uma forte resposta de anticorpos em camundongos, estes anticorpos reconhecem a proteína nativa do parasito como observado em ensaios de Western Blot e imunofluorescência. Além disso, observamos que os anticorpos anti-*PbMTRAP* circulantes na corrente sanguínea de animais imunizados e desafiados reduziram, em alguns experimentos, a conversão de gametas em oocinetos. Nossos resultados indicam que a *PbMTRAP* não representa um alvo potente para o direcionamento de anticorpos para bloquear a transmissão de *Plasmodium*, mas os resultados de inibição da conversão, ainda que marginal, indicam a possibilidade de anticorpos anti-MTRAP agirem de maneira sinérgica com outros antígenos de bloqueio da transmissão.

Palavras chaves: Malária, Transmissão, MTRAP, Fertilização, Vacinas.

ABSTRACT

Malaria vaccine development is one of the major challenges in biomedical sciences. The limited knowledge about the essential antigens and their function in *Plasmodium* life cycle, the antigenic polymorphism and the ability of the parasite to adapt are the main difficulties in vaccine development. This means that few antigens of *Plasmodium* have finished clinical trials and only one reached phase III. Recently, we identified the antigen MTRAP involved in transmission of the parasite form of the mammal host to the mosquito vector. The parasite proteins expressed in sexual stages playing a role in transmission are normally less polymorphic, because they are under reduced selective pressure from the immunological response of the vertebrate host, and thus may be good antigen targets for transmission blocking vaccines. Here, we tested the potential of the *P. berghei* MTRAP to elicit antibodies with the ability of inhibiting gamete fertilization *in vitro*. We induced the production of polyclonal antibodies by immunization of BALB/c mice with a recombinant *PbMTRAP* expressed in *E. coli*. Transmission blocking activity of the anti-*PbMTRAP* was tested through conversion assays *in vitro*. Immunizations with the *PbMTRAP* recombinant protein induced a strong antibody response in mice and these antibodies recognized the native protein by Western Blot and IFA. Furthermore, we observed that circulating anti-MTRAP in the blood stream of immunized and challenged mice reduced, in some experiments, gamete conversion into ookinetes. Our results indicate that *PbMTRAP* does not represent a powerful transmission blocking antigen, although marginal inhibitions of conversion in some experiments suggest it might act synergistically with other transmission blocking antigens.

Key words: Malaria, Transmission, MTRAP, Fertilization, Vaccines

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição da malária. Países com transmissão autóctone e seu status no número de casos até o 2017.	23
Figura 2. Regiões de países endêmicos para a malária que apresentam IPA >50, baseado em dados de 2015	24
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	26
Figura 4. Estágios de vida de <i>Plasmodium</i> e desenvolvimento de vacinas para malária.....	34
Figura 5. Descrição gráfica da estrutura da proteína do circumesporozoíto (CSP) e da vacina RTS,S.....	35
Figura 6. Representação gráfica da estrutura de proteínas da família TRAP em <i>Plasmodium</i>	43
Figura 7. Estratégia para obtenção da proteína recombinante <i>PbMTRAP</i>	48
Figura 8. Esquema de imunização de camundongos.....	50
Figura 9. Estratégia para gerar os parasitos <i>Ookluc</i>	55
Figura 10. Estratégia de clonagem do parasito <i>P. berghei</i> -MTRAP-GFP, onde se representa a sequência wild type do gene e a sequência final de transfecção	58
Figura 11. Primers para genotipagem dos parasitos <i>PbMTRAP</i> -GFP.....	61
Figura 12. Confirmação da expressão da <i>PbMTRAP</i> recombinante..	63
Figura 13. Títulos de anticorpos gerados contra a <i>rPbMTRAP</i>	64
Figura 14. Reconhecimento da proteína nativa pelos anti- <i>PbMTRAP</i> mediante análise de Western Blot.	64
Figura 15. Ensaio de Imunofluorescência de gametócitos de <i>P. berghei</i> ANKA WT com anticorpos anti- <i>PbMTRAP</i> e anti-Poly (I:C) (α -IFA e α - <i>PbMTRAP</i>).....	65
Figura 16. Ensaio de conversão com anticorpos purificados por proteína G-sepharose.	66
Figura 17. Imunização com a <i>PbMTRAP</i> induz anticorpos capazes de impedir a formação de oocinetos, experimento 1	67
Figura 18. Parasitemia (A) e gametocitemia (B) de <i>P. berghei</i> <i>Ookluc</i> em camundongos imunizados com a <i>rPbMTRAP</i> , experimento 1	68
Figura 19. Imunização com a <i>rPbMTRAP</i> induz anticorpos capazes de impedir a formação de oocinetos, experimento 2.....	69

Figura 20. Parasitemia (A) e gametocitemia (B) de <i>P. berghei</i> Ookluc em camundongos imunizados com a rPbMTRAP, experimento 2.....	69
Figura 21. Desenho do experimento para avaliar os títulos de subclasses de IgG de camundongos imunizados com PbMTRAP desafiados e não desafiados.	70
Figura 22. Títulos de subclasses de IgG de soro de camundongos imunizados com a rPbMTRAP medidos por ELISA.	71
Figura 23. Ensaio de conversão com anticorpos circulantes (não purificados), experimento 3	72
Figura 24. Parasitemia (A) e gametocitemia (B) de <i>P. berghei</i> Ookluc em camundongos imunizados com a rPbMTRAP, experimento 3.....	72
Figura 25. Ensaio de conversão com anticorpos purificados por proteína G-sepharose, pré e pós desafio, experimento 3	73
Figura 26. Teste de imunogenicidade e ensaio de conversão experimento 4, camundongos BALB/c.....	74
Figura 27. Parasitemia (A) e gametocitemia (B) de <i>P. berghei</i> Ookluc em camundongos 3 vezes imunizados com a rPbMTRAP, experimento 4.....	75
Figura 28. Camundongos BALB/c imunizados 3 e 4 vezes com a rPbMTRAP, experimento 5	76
Figura 29. Acompanhamento das parasitemias do experimento 5	77
Figura 30. Resumo de ensaios de conversão com anticorpos não purificados.....	78
Figura 31. Análises de restrição do plasmídeo dos parasitos PbMTRAP-GFP	79
Figura 32. Acompanhamento da Parasitemia dos PbMTRAP-GFP	80
Figura 33. Genotipagem dos parasitos PbMTRAP-GFP	81
Figura 34. Parasitos transfectados com fenótipo alterado	81
Figura 35. Média dos dados por dia das condições dentro da BOD	83
Figura 36. Intestino médio de <i>An. darlingi</i>	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Preparação do meio de conversão.....	54
Tabela 2. Primers desenhados para construção do plasmídeo que contém a sequência do gene da green fluorescent protein (GFP) acoplado ao gene da <i>PbMTRAP</i>	57
Tabela 3. Pré-Mix das reações de PCR e perfil térmico.....	58
Tabela 4. Sequência dos primers desenhados para confirmar a presença dos genes inseridos nos parasitos mutantes <i>PbMTRAP</i> -GFP em comparação com parasitos do tipo selvagem. ...	61
Tabela 5. Resumo das condições dos ensaios de alimentação com camundongos infectados com <i>P. berghei</i>	82
Tabela 6. Resumo de dissecções.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	-	Acquired immunodeficiency syndrome
AMA1	-	Apical membrane antigen 1
BSA	-	Bovine serum albumin
CFA	-	Complete Freund's adjuvant
ChAd63	-	Chimpanzee adenovirus 63
CSP	-	Circumsporozoite protein
CTRP	-	Circumsporozoite and thrombospondin related adhesive protein (TRAP) related protein
DARC	-	Duffy antigen receptor for chemokines
DBP	-	Duffy-binding protein
DDT	-	Dicloro difenil tricloroetano
DNA	-	Deoxyribonucleic acid
EGF	-	Epidermal growth factor
ELISA	-	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMP1	-	Erythrocyte membrane protein 1
EPA	-	ExoProteinA
GFP	-	Green fluorescent protein
GPI	-	Glycosylphosphatidylinositol
HBsAg	-	Hepatitis B surface antigen
IFA	-	Incomplete Freund's adjuvant
IPA	-	Índice parasitário anual
IRS	-	Indoor residual spraying
ITNs	-	Insecticide treated nets
LAMP	-	Loop-mediated isothermal amplification
LLINs	-	Long-lasting insecticide treated bednets
malERA	-	Malaria eradication research agenda
ME-TRAP	-	Multi-epitope string - thrombospondin related adhesion protein
MFA	-	Membrane feeding assay
MSP1	-	Merozoite surface protein 1
MTRAP	-	Merozoite thrombospondin related anonymous protein
MVA	-	Modified vaccinia virus ankara

NIH	-	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
PAMPs	-	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	-	Solução salina tamponada
PCR	-	Polymerase chain reaction
Poly (I:C)	-	Polyinosinic-polycytidylic acid
PRR	-	Pattern-recognition receptor
RH5	-	The reticulocyte-binding protein homologue 5
RLR	-	RIG-I-Like receptor
RNA	-	Ribonucleic acid
SMFA	-	Standard membrane feeding assay
SNPs	-	Single nucleotide polymorphisms
TBI	-	Transmission-blocking immunity
TBV	-	Transmission-blocking vaccines
TCA	-	Terapias combinadas com artemisinina
TDR	-	Teste de diagnóstico rápido
TLR3	-	Toll-like receptors type 3
TSR	-	Thrombospondin type-I repeat
VIR	-	Variant interspersed repeats
VLP	-	Virus-like particle
WHO	-	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 A doença da Malária	22
2.2 O parasito <i>Plasmodium</i> e seu ciclo de vida	25
2.3 Patogênese e manifestações clínicas da Malária	27
2.4 Controle da Malária	29
2.5 Vacinas contra a Malária	31
2.5.1 Vacinas pré-eritrocíticas	34
2.5.2 Vacinas de estágios sanguíneas	37
2.5.3 Vacinas de Bloqueio da transmissão	39
2.6 Merozoite Thrombospondin-Related Anonymous Protein	42
3 JUSTIFICATIVA	45
4 OBJETIVOS	46
4.1 OBJETIVO GENERAL	46
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
5 METODOLOGIA	47
5.1 Material biológico - Modelo murino de malária	47
5.1.1 Camundongos e parasitos <i>P. berghei</i>	47
5.2 Obtenção do recombinante <i>PbMTRAP</i>	47
5.2.1 Estratégia de clonagem da <i>PbMTRAP</i>	47
5.2.2 Expressão e purificação do recombinante da <i>PbMTRAP</i> (<i>rPbMTRAP</i>)	48
5.3 Análise do recombinante	48
5.3.1 Eletroforeses em gel de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i>)	48
5.3.2 Western Blot anti-Histidina	49
5.4 Imunização de camundongos	49
5.4.1 Adjuvantes	49
5.4.2 Desenho experimento com anticorpos purificados	50
5.4.2 Desenho experimento com anticorpos não purificados	51
5.5 Teste de imunogenicidade por ELISA	51
5.6. Purificação de anticorpos	52
5.7 Western Blot para testar os anticorpos purificados	52

5.8 Imunofluorescência de gametócitos de <i>P. berghei</i>	53
5.8.1 <i>Gradiente para obtenção de gametócitos</i>	53
5.8.2 <i>Imunofluorescência</i>	53
5.9 Avaliação da capacidade bloqueadora da formação de oocinetos dos anti-<i>PbMTRAP</i>	54
5.9.1 <i>Meio de conversão</i>	54
5.9.2 <i>Parasitos Ooocluc</i>	54
5.9.3 <i>Ensaio de conversão</i>	55
5.10 Testes de infecção de <i>Anopheles darlingi</i> colonizado com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA	56
5.10.1 <i>Infecção de camundongos e mosquitos</i>	56
5.10.2 <i>Avaliação da presença de oocistos</i>	56
5.10.3 <i>Avaliação da presença de Esporozoítos</i>	56
5.10.4 <i>Infecção de camundongos com esporozoítos</i>	56
5.11 Colocalização da <i>PbMTRAP</i> marcada com GFP (Green Fluorescent Protein)	57
5.11.1 <i>Estratégia parasitos <i>PbMTRAP</i>-GFP</i>	57
5.11.2 <i>Amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction) e clonagem no vetor</i> ...	58
5.11.3 <i>Transfecção de Parasitos</i>	59
5.12 Genotipagem de mutantes	60
5.13 Microscopia de fluorescência	61
5.14 Análise estatística	62
6 RESULTADOS	63
6.1 Expressão da <i>P. berghei</i>-MTRAP	63
6.2 Teste de imunogenicidade de camundongos	63
6.3 Anticorpos anti-<i>PbMTRAP</i> reconhecem a proteína desnaturada	64
6.4 Imunofluorescência de gametócitos de <i>P. berghei</i>	65
6.4 Ensaios de conversão com anticorpos purificados	65
6.5 Ensaio de conversão com anticorpos não purificados	67
6.5.1 <i>Experimento 1. Imunização com a proteína <i>PbMTRAP</i>, imunogenicidade, desafio e ensaio de conversão.</i>	67
6.5.2 <i>Experimento 2. Imunização com a proteína <i>PbMTRAP</i>, imunogenicidade, desafio e ensaio de conversão.</i>	68
6.5.3 <i>Experimento 3. Títulos das subclasses de IgG pré e pós desafio</i>	69

6.5.4 Experimento 4. Camundongos C57BL/6	73
6.5.5 Experimento 5. Camundongos BALB/c (3 e 4 imunizações)	75
6.6 Estratégia parasitos PbMTRAP-GFP (Green Fluorescet Protein)	79
6.7 Testes de infecção de Anopheles darlingi colonizado com Plasmodium berghei ANKA	82
6.7.1 Condições da B.O.D.	82
6.7.2 Ensaio de alimentação direta no camundongo.....	82
6.7.3 Dissecções de mosquitos	83
6.7.4 Injeção do extrato de glândulas no camundongo.....	84
7 DISCUSSÃO	85
8 CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS	91
ANEXO.....	103
Anexo A. Predição de epítomos para células B na sequência da PbMTRAP.....	103

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa de grande relevância nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Esta doença ameaça mais de 40% da população mundial, provoca 219 milhões de casos agudos e leva a 435.000 mortes por ano (WHO, 2018). A ampla maioria dos casos (70%) são reportados na África subsaariana, onde crianças pequenas e mulheres grávidas são a população mais vulnerável, e sendo o *Plasmodium falciparum* a principal causa de malária clínica grave e de morte (WHO, 2018).

Malária tem uma alta inequidade na sua distribuição, mais que outras doenças de importância em saúde pública, já que 58% das mortes por malária acomete a população mais pobre, especialmente aquela que vive em condições de vulnerabilidade socioeconômica com carência de acesso a serviços de saneamento básico e no acesso aos serviços de saúde (Heggenhougen et al., 2003).

As principais estratégias para prevenir a malária são o controle vetorial e as terapias preventivas; já as estratégias de controle global desta doença estão focadas principalmente no diagnóstico e tratamento das pessoas infectadas, além do controle vetorial (WHO, 2018). Desde que a artemisinina se constituiu como o componente central no tratamento para a malária, a resistência à este tratamento observada principalmente no sudeste da Ásia tem se convertido num sério obstáculo na eliminação desta doença (malERA, 2017b). Do mesmo modo, a dispersão da resistência aos inseticidas utilizados para o controle vetorial e a mudança de comportamento dos mosquitos vetores comprometem a eficiência dos principais métodos de controle da malária: a borrifação intradomiciliar com inseticidas de efeito residual (IRS) e a utilização de mosquiteiros tratados com inseticidas (ITNs). Por isso, novas ferramentas são urgentemente requeridas para o controle e tratamento da malária (Dumbo et al., 2018).

Estima-se que, só em 2017, 3.1 bilhões de dólares foram investidos pelos governos de países endêmicos e parceiros internacionais nas estratégias de controle e eliminação da malária global (WHO, 2018). Do total investido, os países endêmicos contribuíram com 29%; enquanto os colaboradores internacionais contribuíram com o restante da seguinte forma: Estados Unidos, 39%, países membros do comitê de assistência ao desenvolvimento, 21%, Reino Unido, 9% e a fundação Bill & Melinda Gates, 2% (WHO, 2018).

A erradicação da malária requer investimento contínuo na implementação de medidas que levem à eliminação, à interrupção da transmissão autóctone de uma espécie específica de parasito numa área geográfica definida e, em segunda instância, à prevenção do

restabelecimento da transmissão (NIH, 2011). Conquistar a eliminação é possível através de estratégias de controle vetorial, as quais reduzem o risco de infecção, e da quimioprevenção, que suprime o progresso da doença (NIH, 2011).

Um número considerável de países tem conquistado ou estão em vias de conquistar a eliminação da malária mediante a combinação de estratégias que envolvem o controle de vetores, o manejo eficiente de casos e a vigilância ativa. Em todos os casos a eliminação é conquistada com o uso das ferramentas existentes para a prevenção, diagnóstico e tratamento (malERA, 2017c).

Em 2016, a organização mundial da saúde identificou 21 países com potencial para eliminar a malária em 2020. Este é o número de países com menos de 100 casos autóctones, o que é um forte indicativo de que nestes locais a eliminação da malária está sendo conquistada. Houve um aumento no número de países pertencentes a este grupo a cada ano, sendo 15 países em 2010, 21 países em 2016 e 26 países em 2017 (WHO, 2018). Seguindo o crescente número de países em vias de conquistar a eliminação, também cresce o número de países que eliminaram a malária: o Paraguai foi certificado como livre de malária em 2018, enquanto a Argélia, a Argentina e o Uzbequistão têm feito petição formal para obter a certificação. Também, China e El Salvador reportaram zero casos autóctones, enquanto Malásia conseguiu zero casos autóctones de malária humana, mas reporta casos de malária zoonótica (em humanos) causada por *P. knowlesi* (WHO, 2018, 2019).

O objetivo global para a redução da transmissão e eliminação, demarcado pelo documento de estratégia técnica global para a malária 2016–2030, reflete na alta aceitação dos programas de intervenção que atuam nas comunidades como: vigilância robusta, sistemas de reporte e resposta, prevenção com fornecimento de inseticidas e métodos de barreira para impedir as picadas; diagnóstico e tratamento com combinações efetivas de medicação e avanços no desenvolvimento de vacinas (malERA, 2017c).

De acordo com o “roteiro de tecnologias para vacinas contra a malária” que foi atualizado em 2013, um dos objetivos propostos neste documento é desenvolver até 2030 uma vacina com eficácia protetora de ao menos 75% contra a malária clínica ocasionada por *P. falciparum* e *P. vivax* e a redução da transmissão do parasito. Este documento esclarece e organiza as prioridades no desenvolvimento de vacinas para malária e traz as diretrizes para o estabelecimento de políticas de comercialização de tais vacinas no caso da sua descoberta (malERA, 2017a).

Dessa forma, o investimento em ciência para o controle e eliminação definitiva da malária global é em parte justificado pela sua contribuição no desenvolvimento de vacinas que evitam a malária clínica e interrompem a transmissão do parasito (malERA, 2017a).

Neste contexto, vacinas baseadas em antígenos de estágios sexuais e/ou do ciclo esporogônico que interrompem a transmissão representam estratégia promissora para reduzir a prevalência da infecção causada por *Plasmodium* em países endêmicos. Dessa forma, nós propomos avaliar o potencial antigênico da PbmTRAP, que é uma molécula de superfície de gametócitos e gametas presentes em diferentes espécies de *Plasmodium*, e a sua capacidade no bloqueio da transmissão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A doença Malária

Malária, ou paludismo, é uma doença tropical considerada um dos mais sérios problemas de saúde pública no mundo. Esta doença é causada pelo parasito protozoário *Plasmodium*, o qual foi descoberto pelo médico militar francês Charles Louis Alphonse Laveran, em 1880, em amostras de sangue de militares doentes na Argélia (Laveran, 1881).

O gênero *Plasmodium* compreende mais de 120 espécies de parasitos que infectam mamíferos, aves e répteis das quais só 6 são conhecidos com potencial para causar infecção em humanos (Ashley et al., 2018). *P. falciparum* e *P. vivax*, são as espécies de maior importância em saúde pública por sua alta prevalência, distribuição e pela gravidade da doença que causam (Miller et al., 2013); *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. malariae* são menos comuns mas a patogenia da doença é similar a *P. vivax*; e *P. knowlesi*, que parasita principalmente macacos, com características de transmissão zoonótica que tem sido reportada em países do sudeste da Ásia (Ahmed & Cox-Singh, 2015).

O parasito é transmitido ao humano através da picada do mosquito fêmea *Anopheles*, que injeta na pele a saliva que contém as formas infectantes de *Plasmodium* (Ménard et al., 2013). Existem mais de 400 espécies de mosquitos *Anopheles*, dos quais 30 são vetores de maior importância para malária e se caracterizam por ter seus repastos sanguíneos entre o crepúsculo e o amanhecer (WHO, 2018).

A malária se caracteriza por apresentar uma síndrome febril com um período de incubação de 10-14 dias para *P. falciparum* ou *P. knowlesi*, 2 – 3 semanas para *P. vivax* e *P. ovale*, e 18 dias ou mais para *P. malariae* (White et al., 2014). *P. falciparum* é agente etiológico da forma grave da doença com manifestações variáveis (febre, calafrios, dores de cabeça, dor muscular, debilidade, vômito, tosse, diarreia e dor abdominal) que podem evoluir para comprometimento de órgãos ocasionando falência renal, edema pulmonar, convulsões generalizadas, colapso circulatório seguido do estado de coma e morte (WHO, 2010). A intensidade da transmissão depende de fatores relacionados ao parasito, ao vetor, ao hospedeiro humano e ao ambiente (WHO, 2018).

Sendo a malária uma parasitose endêmica de zonas tropicais e subtropicais, ela afeta a população de 91 países onde 3,3 bilhões de pessoas estão em risco de contrair a infecção (Figura 1). Em 2017, 219 milhões de casos e 435,000 mortes foram registrados, principalmente em

regiões endêmicas da África subsaariana e sudeste da Ásia (WHO, 2018). Nigéria (25%), República democrática do Congo (11%), Moçambique (5%), Índia (4%) e Uganda (4%), contribuem com a metade dos casos de malária mundial, sendo o *P. falciparum* a espécie mais prevalente nestes países (WHO, 2018).

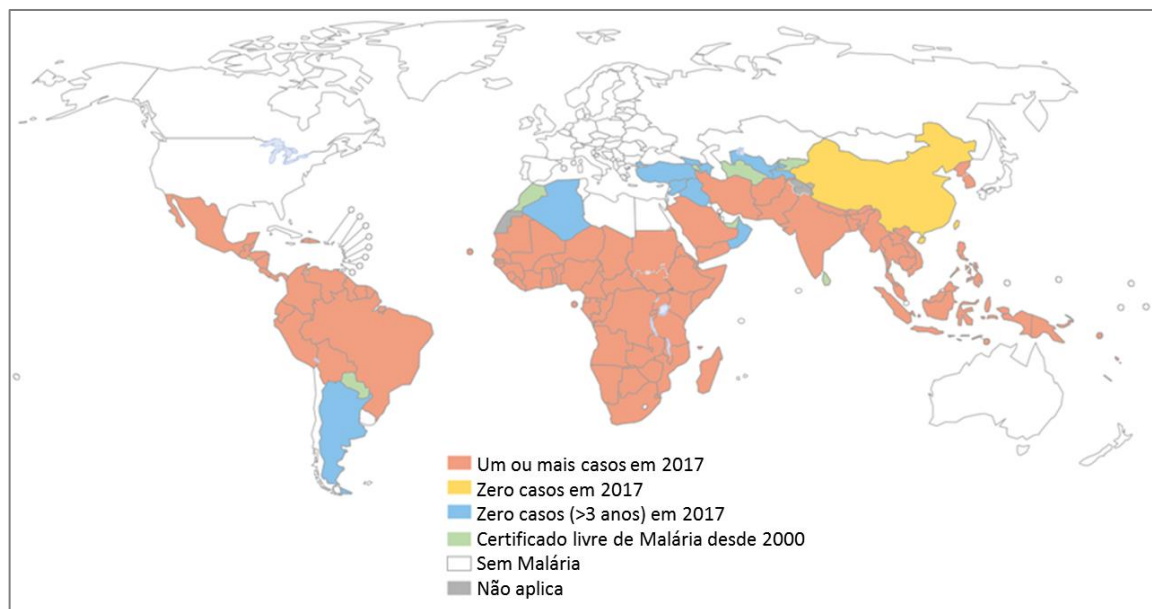


Figura 1. Distribuição da malária. Países com transmissão autóctone e número de casos até 2017. Países com casos autóctones de malária em 2000 e seu status em 2017. Adaptado de WHO, 2018.

Na América Latina, o panorama da malária é diferente ao dos países Africanos, mas é igualmente preocupante, já que embora existam regiões tropicais e subtropicais de baixa transmissão, estas são intercaladas com *hot-spots* onde a transmissão é local e temporalmente restrita (Ferreira & Castro, 2016). Atualmente, estima-se que cerca de 102 milhões de pessoas morem nas áreas de risco de transmissão de malária. A maioria dos casos na América Latina são provenientes da Região Amazônica, sendo Venezuela (34.4%), Brasil (18%), Colômbia (15.3%) e Peru (14.3%) os países que mais contribuem com a prevalência de malária no continente, onde as infecções são ocasionadas principalmente por *P. vivax* (69%) e por *P. falciparum* (27%) (Conn et al., 2018; WHO, 2017).

No Brasil, o número de casos de malária foi o mais alto da América Latina por muitos anos, mas no período de 2000–2014 foi registrado uma redução considerável no número de casos (redução de 76,8%) (Ferreira & Castro, 2016). Atualmente, o Brasil é o país que registra o segundo maior número de casos (18%) na América Latina, sendo 99.5% desses casos provenientes da Região Amazônica que compreende os estados do Acre, Amazonas, Amapá,

Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, correspondendo a 60% do território do país (Ferreira & Castro, 2016). Desde 2005, o estado do Acre tem registrado o mais alto Índice Parasitário Anual (IPA) no Brasil (IPA>50), sendo a região do Vale do Juruá que compreende os municípios de Cruzeiro do Sul, Mâncio Lima e Rodrigues Alves os locais que persistem como *hot-spots* para malária (Figura 2) (Lana et al., 2017).

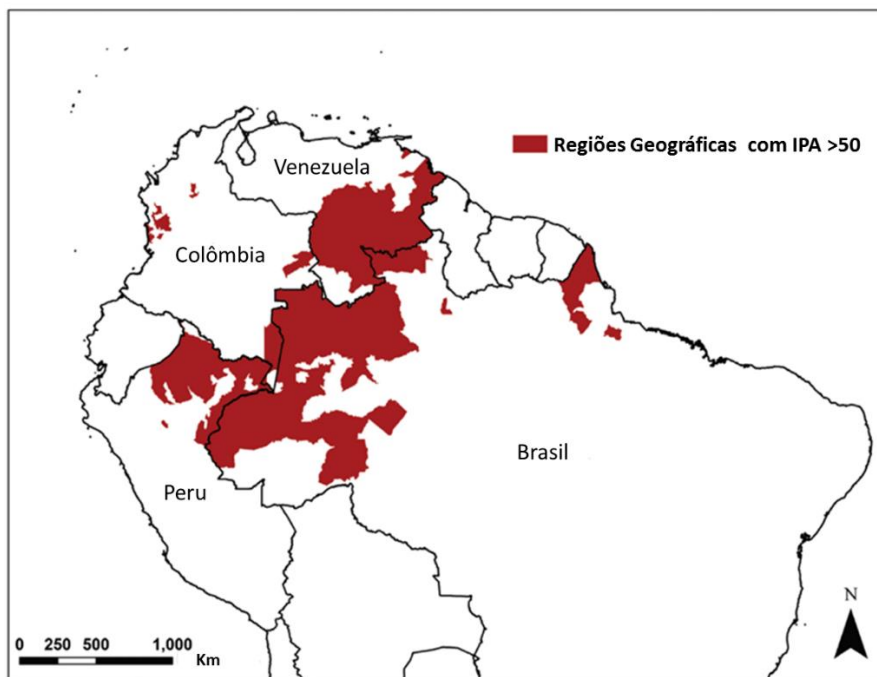


Figura 2. Regiões de países endêmicos para a malária que apresentam IPA >50, baseado em dados de 2015. Adaptado de Conn et al., 2018.

Na região endêmica amazônica do Brasil, é observado um menor número de casos de malária ocasionada por *P. falciparum* (11% de todos os casos), sendo *P. vivax* responsável por 89% dos casos de malária na região (Ferreira & Castro, 2016). Essa predominância de *P. vivax* depende em grande medida pelas suas características biológicas. Por um lado, as baixas densidades de parasitos circulantes dificultam o diagnóstico em muitos casos, e por outro lado, a capacidade do parasito de persistir na sua forma dormente intra-hepática pode causar recaídas de infecção, reduzindo notoriamente a eficácia das estratégias de controle e aumentando o risco de transmissão (Olliaro et al., 2016).

Além dos registros de casos autóctones para malária provenientes da Amazônia, no Brasil são reportados uma pequena porção de casos (0,05%) em regiões do sul e sudeste do país que compreendem os estados de Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, os quais se caracterizam pela presença do ecossistema de Mata

Atlântica (Pina-Costa et al., 2014). Nestas regiões, a transmissão do parasito é ocasionada por espécies de *Anopheles* do subgênero *Kerteszia* (distinto do subgênero *Nyssorhynchus*, onde se inclui o *An. darlingi*, principal vetor da Região Amazônica), os quais desenvolvem seu ciclo larval nas axilas das folhas de bromélias que são abundantes na floresta (Marrelli et al., 2007). A malária bromélia, como é conhecida, embora seja pouco frequente no Bioma da Mata Atlântica, tem se tornado problema difícil de resolver, já que a transmissão residual nos focos restantes envolve espécies como *P. vivax* e *P. malarie*, e a participação de reservatórios não-humanos, macacos dos gêneros *Cebus* e *Alouatta*, que são hospedeiros potenciais de *Plasmodium* (Deane, 1992). Assim mesmo, nas regiões sul e sudeste do país circula o parasito de primatas *Plasmodium simium*, semelhante ao parasito de humanos *P. vivax*. Recentemente, foi confirmado que esta espécie de parasito infecta naturalmente humanos (Brasil et al., 2017). Esta transmissão zoonótica do parasito da malária desde o macaco até o humano, como já foi observado com as espécies de macacos *P. knowlesi* e *P. cynomolgi* no sudeste da Ásia, empiora o panorama da malária nas regiões endêmicas e atenta contra o controle e a eventual eliminação da malária no Brasil (Brasil et al., 2017).

2.2 O parasito *Plasmodium* e seu ciclo de vida

Os parasitos pertencentes ao gênero *Plasmodium* são incluídos dentro da ordem Haemosporida do filo Apicomplexa, do qual fazem parte diferentes parasitos protozoários de importância médica. Todos os apicomplexas são parasitos intracelulares obrigatórios, a maioria cresce e se replica dentro de um vacúolo parasitóforo. A proliferação destes organismos acontece pela invasão das células do hospedeiro, seguida pelo crescimento e multiplicação do parasito até que a célula hospedeira seja lisada (Morrissette & Sibley, 2002).

No caso específico do *Plasmodium*, este apresenta um ciclo de vida complexo que envolve a diferenciação em formas que invadem distintos tipos de tecidos dos hospedeiros (Figura 3). O parasito é transmitido pela picada de mosquitos *Anopheles* fêmea infectados, os quais durante o repasto sanguíneo injetam os esporozoítos na pele do hospedeiro vertebrado. Parte dos esporozoítos chega aos vasos sanguíneos e migram até o fígado para invadir os hepatócitos. Dentro do hepatócito, os esporozoítos se transformam num esquizonte tecidual que dá origem a centenas de merozoítos. Os merozoítos são liberados na corrente sanguínea e invadem as hemácias, onde ocorre esquizogonia sanguínea com a produção de novos merozoítos. Com a ruptura da hemácia parasitada os novos merozoítos são liberados e invadem

novas hemácias, dando início ao chamado ciclo sanguíneo (Ménard et al., 2013). A ruptura e consequente liberação de parasitos na corrente sanguínea de maneira repetitiva é o que causa os sintomas característicos da malária. Cada ciclo de invasão e lise das células infectadas causa o dano tecidual responsável pelos principais sintomas da doença (tremores, febre, dor nas articulações e anemia) (Bartoloni & Zammarchi, 2012).

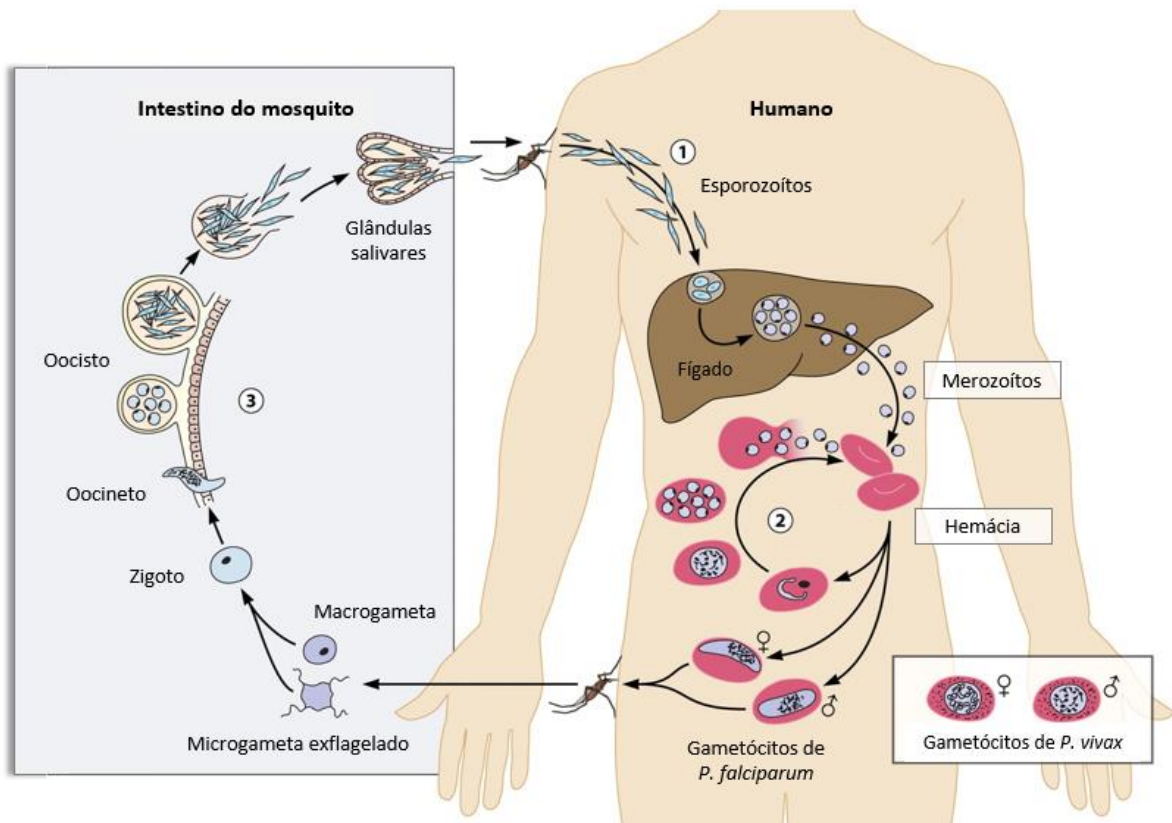


Figura 3. Ciclo de vida do *Plasmodium*. 1. Estágios de vida pré hepático (Esporozoítos) e do ciclo intra-hepático (Esquizonte tecidual). 2. Fase eritrocítica e desenvolvimento da fase sexual sanguínea (Merozoítos, trofozoítos, esquizonte e gametócitos). 3. Desenvolvimento do ciclo de *Plasmodium* no inseto *Anopheles*, ciclo esporogônico (Zigoto, oocineto, oocisto, esporozoítos). Adaptado de Bousema & Drakeley, 2011.

Quando o merozoítos infecta a hemácia, este modifica a superfície da célula para expor proteínas do parasito que são responsáveis pela adesão da célula infectada a moléculas presentes na superfície de células endoteliais, o que se conhece como citoadesão (Smith et al., 2014). Este processo impede a circulação das formas maduras do parasito, que permanecem aderidas, e evita a eliminação do parasito no baço. A citoadesão na microvasculatura de órgãos específicos como o cérebro é a principal causa de malária grave, responsável pela alta mortalidade em crianças de zonas endêmicas (Smith et al., 2014). Até há pouco tempo considerava-se que a citoadesão acontecia unicamente na malária por *P. falciparum*, mas recentemente foi

demonstrado que *P. vivax* também pode induzir este fenômeno e pode comprometer órgãos como o pulmão, provocando formas graves da doença (Carvalho et al., 2010).

Durante o ciclo sanguíneo, uma parte dos merozoítos que invadem as hemácias se transformam em gametócitos, que são as formas sexuadas do parasito e o estágio infectante para o mosquito *Anopheles* (Ménard et al., 2013). Quando o inseto faz o repasto sanguíneo, ingere gametócitos fêmeas e machos, os quais são ativados no intestino do mosquito. O gametócito fêmea se transforma em um macrogameta e o gametócito macho da origem a 8 microgametas flagelados mediante um processo conhecido como exflagelação. Os gametas que conseguem sair do vacúolo parasitóforo e da célula hospedeira se fertilizam e formam um zigoto. O zigoto se transforma em uma forma móvel (oocineto) que migra até a parede do intestino do inseto formando o oocisto dentro do qual se desenvolverão os esporozoítos. Centenas de esporozoítos são liberados na hemolinfa do mosquito e migram até as glândulas salivares, de onde são transferidos para um novo hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, iniciando assim um novo ciclo (Ménard et al., 2013).

2.3 Patogênese e manifestações clínicas da Malária

Toda a patogenia da malária é ocasionada pela fase sanguínea dos estágios assexuados do parasito; os estágios hepáticos (pré-eritrocítico) e sexuados (gametócitos), não causam manifestações clínicas. A patologia resulta da reação dos mecanismos de proteção do hospedeiro com os produtos da destruição dos eritrócitos e produtos do metabolismo dos parasitos liberados na circulação (Sherman, 2001). Tipicamente observa-se picos periódicos de febre, que correspondem à duração do ciclo eritrocítico e variam de acordo com a espécie de *Plasmodium* infectante, 48 horas para *P. vivax*, *P. falciparum* ou *P. ovale* e 72 horas para *P. malariae* (White et al., 2014). Os principais sintomas da malária não são específicos e incluem mal-estar, dor de cabeça, fadiga, dor muscular e abdominal, os quais são seguidos pela febre intermitente. A maioria dos pacientes com malária não complicada apresentam poucos sinais além da febre, anemia leve e em alguns casos esplenomegalia (White et al., 2014). No caso da malária grave, as manifestações vão depender da idade do paciente, do nível de parasitismo e do estado imunológico do hospedeiro. Na África, por exemplo, as mortes ocorrem principalmente em crianças e prevalece a manifestação das síndromes de anemia grave, malária cerebral e desconforto respiratório, os quais podem aparecer de maneira separada ou conjunta (Marsh et al., 1995). A malária cerebral é tecnicamente definida como a presença do estado de

confusão mental ou coma ocasionado pela infecção pelo *P. falciparum*. Nesta condição, e de acordo com a descrição histopatológica, existe um sequestro extensivo de formas infectantes maduras do parasito na microvasculatura cerebral (Taylor & Molyneux, 2015).

Na infecção por *P. falciparum* são identificados eritrócitos com parasitos maduros sequestrados nos vasos sanguíneos, evitando assim sua remoção no baço e causando danos em células endoteliais e a obstrução da microvasculatura. A citoadesão apresentada em *P. falciparum*, é mediada por proteínas do parasita expressas na membrana dos eritrócitos chamadas PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1). Estas proteínas pertencem a um grupo de proteínas variáveis clonalmente que são expostas na superfície de eritrócitos infectados e são codificadas pela família de genes *var*. Os subtipos de PfEMP1 permitem a adesão a diferentes tipos de receptores endoteliais, o que traz como consequência o sequestro e a disfunção endotelial de diferentes órgãos como cérebro, pulmão e vilosidades da placenta, causando malária cerebral, desconforto respiratório e malária placentária respectivamente (Rogerson, 2017; Turner et al., 2013).

A infecção pelo *P. vivax*, embora seja definida como “benigna”, causa morbidade considerável em diferentes regiões endêmicas do mundo, inclusive num âmbito maior do que o observado pelo *P. falciparum* (Martin & Vinetz, 2018). De igual importância, já foi observado que muitos tipos de malária grave, antes considerada ser específica de *P. falciparum*, comumente acontece também em pessoas infectadas pelo *P. vivax* (Nosten et al., 1999). Em algumas áreas endêmicas, a progressão da malária ocasionada por *P. vivax* até a forma clínica grave, que inclui malária cerebral e síndrome do desconforto respiratório agudo, foi encontrado como o que acontece frequentemente nas infecções por *P. falciparum*, inclusive com níveis similares de letalidade (Anstey et al., 2009; Genton et al., 2008). Recentemente, evidências da citoadesão ao endotélio e placenta de formas sanguíneas maduras de *P. vivax* em ensaios *ex vivo*, foram obtidas (Carvalho et al., 2010). Embora os níveis de citoadesão de eritrócitos infectados por *P. vivax* foi 10 vezes menor que dos infectados com *P. falciparum*, a força da interação foi similar. A citoadesão de *P. vivax* parece ser mediada por proteínas VIR (Variant interspersed repeats), codificadas pelos genes variantes do mesmo nome (Carvalho et al., 2010).

Durante a malária, é aumentada a função imune esplênica e a hemocaterese, o que acelera a remoção de eritrócitos parasitados e não parasitados. A ruptura dos esquizontes libera material celular do hospedeiro e do parasito na corrente sanguínea, o qual ativa os monócitos e macrófagos e induz a liberação de citocinas pro inflamatórias, causando febre e outros efeitos patológicos (Ayimba et al., 2011; Buffet et al., 2011).

O acontecimento de complicações clínicas por malária depende então de uma variedade de fatores intrínsecos do hospedeiro e do parasito, estado imunológico e resistência ao tratamento, assim como também das condições epidemiológicas, que podem modular a intensidade da transmissão numa área determinada.

2.4 Controle da Malária

A malária pode ser prevenida e tratada, e diferentes estratégias para seu controle e eliminação têm sido desenvolvidas e aplicadas nas últimas décadas. Já que na transmissão da malária estão envolvidos 3 participantes (o homem, o parasito e o vetor) o controle da mesma tem que ser dirigido ao desenvolvimento de estratégias focadas em cada um destes atores. Atualmente, o diagnóstico, tratamento e controle vetorial são os três pilares básicos no controle da doença (WHO, 2018).

O diagnóstico correto e precoce aliado ao tratamento imediato e eficaz encurtam a duração da infecção, impedindo o desenvolvimento de complicações clínicas e a transmissão do parasito. De acordo com a guia clínica para o manejo da malária, o diagnóstico por microscopia, considerado o padrão ouro para malária, ou o teste de diagnóstico rápido (TDR), são os mais recomendados nas regiões de media e alta transmissão (WHO, 2014a). Por outro lado, nas zonas endêmicas de baixa transmissão, além dos métodos de diagnóstico convencionais, a aplicação de um diagnóstico molecular é de vital importância na detecção de parasitos em baixas densidade em pacientes assintomáticos, mas alguns métodos como LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) ainda estão em fase de teste (malERA, 2017a).

Uma extensa lista de moléculas tem sido desenvolvida e testada como tratamento para a malária. Desde o descobrimento da quinina, alcaloide com atividade antimalárica extraído de *Cinchona ledgeriana*, diferentes drogas sintéticas, como 8-aminoquinolina, pamaquina, 9-aminoacridina e atebrina (Desenvolvidas entre 1925 e 1930), têm sido baseadas na sua estrutura (Cowman & Foote, 1990). Outros antimaláricos como 4-aminoquinolina cloroquina e o 8-aminoquinolina primaquina, assim como os antifolatos, pirimetamina, proguanil e sulfadoxina foram desenvolvidos durante a segunda guerra mundial (Sherman, 2001).

A eficácia no uso da cloroquina, pirimetamina e a primaquina foi evidente durante a campanha de erradicação da malária empreendida nos anos 50s e 60s, quando seu uso foi realizado em grande escala, mas esta campanha fracassou em seu objetivo de eliminação da doença em muitos lugares do mundo, em parte devido à emergência e dispersão de parasitos

resistentes a estes medicamentos (Cowman & Foote, 1990). Foi então no começo da década dos 60s, e através de um intenso programa de procura de novas drogas alternativas, que surgiram os compostos halofantrina, mefloquina, artemisinina e atovaquona (Sherman, 2001).

O uso de um forte portfólio de combinação de medicinas com diferentes mecanismos de ação é necessário para combater a resistência a medicamentos. Na atualidade, as terapias combinadas com artemisinina (TCA) são usadas principalmente para o tratamento das infecções com *P. falciparum*. Os derivados da artemisinina são um grupo de compostos semissintéticos, rapidamente efetivos, seguros e bem toleráveis, produzidos a partir de um produto natural derivado de *Artemisia annua* (Ashley et al., 2018). A artemisinina e seus derivados permitem uma eliminação mais rápida dos parasitos e sua combinação com drogas de diferentes classes tem permitido: 1. Incrementar a taxa de cura completa, 2. Encurtar a duração da terapia 3. Diminuir a seleção e dispersão de parasitos resistentes (White & Olliaro, 1996).

Há cerca de 10 anos foi reportado nos limites entre Camboja e Tailândia o primeiro caso de retardo na eliminação do parasito mediante tratamento com TCA, sugerindo a resistência à artemisinina (Noedl et al., 2008). A resistência à artemisinina já foi reportada em 5 países da sub-região do Grande Mekong, que inclui Camboja, Myanmar, Laos, Tailândia e Vietnam. A resistência do parasito foi associada com mutações não sinônimas de polimorfismo de nucleotídeo simples (SNPs pela sigla em inglês: single-nucleotide polymorphisms) no domínio beta-hélice de uma proteína kelch (K13), a qual é codificada pelo gene PF3D7_1343700 no cromossoma 13 (Huang et al., 2015). A resistência à artemisinina pode ter se espalhado ou surgido no Bangladesh e depois ter se estendido por Myanmar e nos limite com a Índia, onde foi possível fazer o monitoramento da mutação do K13 (Tun et al., 2015). Na América do sul, a resistência à artemisinina já foi detectada em Guiana, Suriname, Guiana Francesa e nos limites entre Venezuela e Brasil (Chenet et al., 2016; Vreden et al., 2013). No Brasil, atualmente não existe uma evidência da resistência de parasitos a derivados da artemisinina, mas algumas cepas de parasitos resistentes podem circular nas regiões de fronteira, principalmente em áreas de garimpo. Entretanto, não existem dados disponíveis de resistência de *P. falciparum* em brasileiros que retornam das áreas onde se suspeita que a resistência é emergente (Vreden et al., 2013). Portanto, no Brasil os tratamentos de primeira linha fornecidos gratuitamente em postos de saúde regulados pelo governo são Cloroquina-Primaquina para tratar a malária ocasionada por *P. vivax* e uma terapia combinada com artemisinina (atualmente Arteméter-Lumefantrina-Primaquina) para infecções pelo *P. falciparum* (Ferreira & Castro, 2016).

Dezenas de espécies de *Anopheles* podem estar envolvidas na transmissão da malária, e uma ampla gama de desafios tem que ser superados no que se refere ao controle dos vetores para que as estratégias sejam efetivas. Com o advento do DDT (Dicloro difenil tricloroetano) e suas propriedades como inseticida, iniciou-se a era desta poderosa ferramenta para interromper a transmissão, e foi assim que nos anos 50s foi lançada a campanha global para a erradicação da malária (Griffith, 1966). Apesar do sucesso em países de clima temperado, a campanha foi desacreditada pelo insucesso nas regiões endêmicas africanas, devido à resistência ao DDT por parte dos anofelinos, o que trouxe que a campanha fosse descontinuada (Sherman, 2001; Stapleton, 2004).

Na atualidade, as principais ferramentas para o controle vetorial estão baseadas no uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas de longa duração (LLINs em inglês: Long-Lasting Insecticide Treated Bednets) e borrifação intradomiciliar com inseticidas de efeito residual (IRS). Estas estratégias têm permitido a redução da morbidade e mortalidade pela malária nas regiões de alta transmissão onde os vetores são majoritariamente intradomiciliares, como é o caso dos vetores do complexo *An. gambiae* (WHO, 2014b). Apesar de toda a eficiência dos LLINs e IRS, sua eficácia também está sendo ameaçada pela resistência generalizada dos anofelinos aos piretróides, único inseticida usado em LLINs (Curtis et al., 1998)

2.5 Vacinas contra a Malária

A maioria das vacinas disponíveis atualmente foram em grande parte desenvolvidas empiricamente, com pouco ou nenhum entendimento sobre como elas ativam o sistema imunológico. A vacinação é uma intervenção altamente eficiente em saúde pública, especialmente naquelas comunidades onde é difícil o acesso ao tratamento, e no caso de doenças infecciosas crônicas de grande impacto em saúde pública.

No caso específico da malária, uma das maiores limitações para a criação de uma vacina é a dificuldade para manter uma proteção durável depois da imunização, devido em parte aos antígenos pouco imunogênicos, mas também ao próprio efeitos da evasão da resposta imune do hospedeiro por parte do parasito (Coelho et al., 2017).

Evidentemente, o processo de criação de vacinas para a malária é longo e complexo, e requer a combinação de diferentes passos. Os passos iniciais envolvem pesquisa básica. É nesse momento que se faz a identificação de um antígeno relevante o qual é estudado como candidato

vacinal em diferentes formulações a fim de gerar proteção de modelos animais. Então dá-se início aos testes pré-clínicos para avaliar a segurança e a eficácia do candidato vacinal em outros modelos animais e a capacidade de produzir a vacina em larga escala de modo controlado. Os ensaios clínicos são feitos em 4 fases que vão desde testes iniciais de toxicidade e tolerância de humanos à vacinação, passa pelos estudos de imunogenicidade em indivíduos saudáveis não expostos ao patógeno, ensaios de proteção em pequena escala até ensaios de proteção em larga escala em regiões endêmicas. Os resultados gerados em cada uma destas fases de estudo podem conduzir à fase seguinte de estudos clínicos até que seja feito o licenciamento da vacina, ou pode levar a pesquisas adicionais (estudos clínicos ou pré-clínicos) para melhorar a capacidade de proteção da vacina, diminuir efeitos adversos, ou para melhorar questões relacionadas a manufatura ou podem terminar com a rejeição da vacina (Ouattara & Laurens, 2015; PATH, 2010).

Muitos grupos têm buscado desenvolver uma vacina eficaz para a malária. O entendimento dos mecanismos celulares e moleculares que atuam na proteção de modelos animais e de humanos foi crucial para os avanços que obtivemos nesta área até o momento (Draper et al., 2018). Consequentemente, alguns estudos vacinais estão baseados no uso de parasitos irradiados ou genética/quimicamente atenuados, infecção com parasitos vivos em indivíduos profilaticamente tratados e vacinas de subunidade (Mauduit et al., 2018).

A pesquisa de uma vacina contra a malária começou nos anos 30. Naquela época estudava-se a utilização de parasitos inativados ou mortos em vacinação, mas estes falharam em gerar imunidade e proteção. A partir destes resultados o estudo de adjuvantes ganhou importância, uma vez que foi demonstrado aumento da imunogenicidade de candidatos a vacinas em combinação com um adjuvante em modelos animais não murinos (Freund et al., 1943). Posteriormente, o sucesso da vacinação com esporozoítos irradiados de *P. falciparum* injetados diretamente pelo mosquito em modelos de malária em roedores permitiu a realização do primeiro ensaio clínico de vacinas contra a malária (Clyde et al., 1973; Nussenzweig et al., 1967). Já que este modelo de vacinação foi considerado como impossível de realizar em campanhas de vacinação em massa, surgiu em 1980 a pesquisa de vacinas baseadas em peptídeos sintéticos de proteínas imunogênicas do parasito (vacinas de subunidade).

Ensaio clínico de campo para avaliar a eficácia contra a malária clínica foram conduzidos na década de 1990 com a vacina de subunidade SPf66 que continha sequências de três antígenos de estágios sanguíneos de *P. falciparum* e a proteína do circumsporozoítos (CSP). Este estudo mostrou uma redução modesta nas parasitemias de *P. falciparum* na regiões

endêmicas da América do Sul, mas nenhuma proteção em pacientes da África (Saul et al., 1999).

Avanços nas metodologias para manter cultura de parasitos e sequenciamento do genoma de *P. falciparum* aumentaram a esperança para o desenvolvimento de vacinas para malária (Greenwood & Targett, 2009).

Esforços para aumentar a imunogenicidade e a durabilidade da proteção das vacinas têm incluído o uso de novos adjuvantes, assim como a alteração do esquema de vacinação, dosagem e métodos de administração têm sido testados (Draper et al., 2015; Hoffman et al., 2015). Apesar disso, uma proteção de longa duração ainda não foi possível.

Não obstante, depois de 35 anos de pesquisa e ensaios clínicos, a única vacina que já teve um progresso até testes de fase 3 é a RTS,S, a qual mostrou uma eficácia de 30% em recém nascidos e de 50% em crianças de 5 – 17 meses de idade (Agnandji et al., 2012). Estes resultados estão muito longe dos esperados para uma vacina ideal, mas a urgência por uma vacina contra a malária levou a RTS/AS01E a entrar em processo de licenciamento pelas agências regulatórias.

As vacinas para a malária podem ser divididas em três grupos principais baseadas nos estágios de desenvolvimento do parasito: Vacinas pré-eritrocíticas, vacinas de estágio sanguíneos, e as vacinas de bloqueio da transmissão (Figura 4).

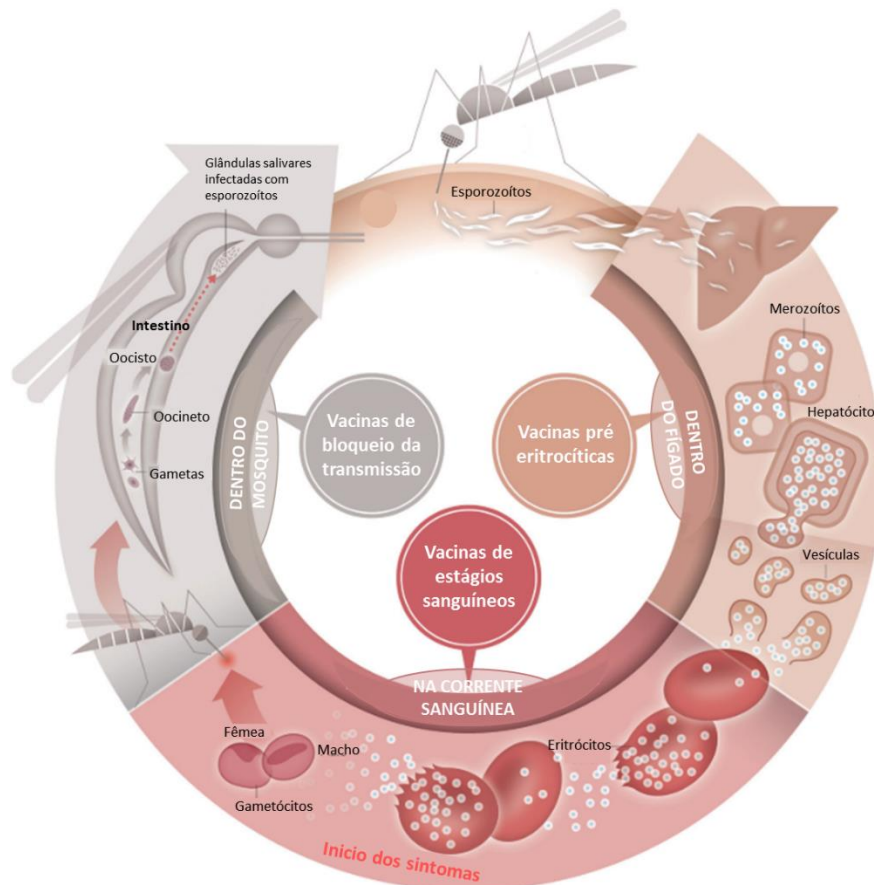


Figura 4. Estágios de vida de *Plasmodium* e desenvolvimento de vacinas para malária. Vacinas baseadas em antígenos pré eritrocíticos, procuram prevenir a infecção. Vacinas baseadas em antígenos de fase sanguínea, buscam prevenir a patogenia. Vacinas de bloqueio da transmissão, interrompem o ciclo esporogônico e a dispersão do parasito. Adaptado de Ouattara & Laurens, 2015.

2.5.1 Vacinas pré-eritrocíticas

As vacinas pré-eritrocíticas têm como alvos o esporozoítos e os estágios hepáticos de *Plasmodium*. Estas vacinas têm por objetivo a eliminação do parasito durante a infecção precoce, prevenindo a doença e evitando a transmissão (Coelho et al., 2017). Uma resposta imune efetiva, tanto humoral como de células T, deve atuar rapidamente com o fim de evitar a chegada dos esporozoítos ao fígado ou o seu desenvolvimento nos hepatócitos. O exemplo mais claro deste tipo de vacina é a RTS,S que contém a proteína do circumesporozoítos (CSP), expressa na superfície do esporozoítos. Esta proteína é composta por 412 aminoácidos, com 37 tetrapeptídeos repetidos num domínio central conservado (Figura 5) (Dame et al., 1984; Kappe et al., 2004). Ensaios *in vitro* confirmaram que anticorpos anti-CSP inibem a invasão de esporozoítos. Estes resultados também foram reproduzidos em condições *in vivo*, onde se

avaliou que anticorpos monoclonais anti-CSP bloqueiam a infecção experimental (Potocnjak et al., 1980).

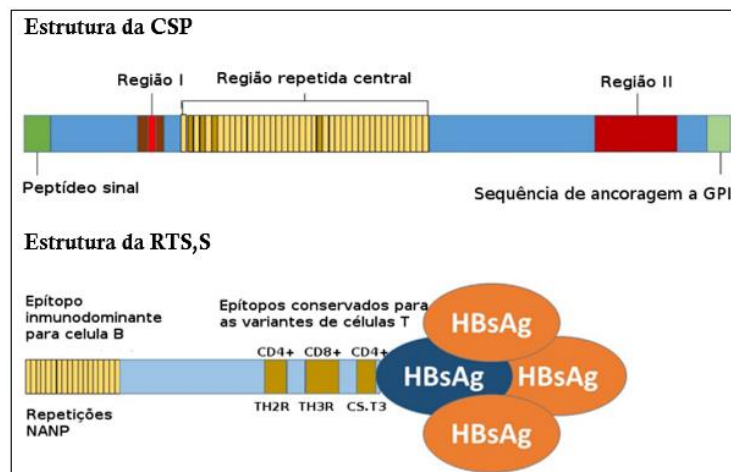


Figura 5. Representação gráfica da estrutura da proteína do circumesporozóito (CSP) e da vacina RTS,S. CSP (sequência repetitiva de aminoácidos NANP:N-acetylneuraminic acid phosphatase), e a porção “T” (epítipo para célula T), a qual inclui epítopos para célula T separado por epítopos imunodominantes CD4+ e CD8+ (Th2R e Th3R). Este peptídeo combinado (RT) é fusionado ao N-terminal de HBsAg, porção superficial (S). Uma segunda porção S não fusionada, daqui o nome de RTS,S. Adaptado de David C. Kaslow & Biernaux, 2015.

A **RTS,S** é a vacina pré-eritrocítica para a malária mais avançada na atualidade. Esta foi construída como uma partícula viral (VLP: Virus-Like particle) formada por 18 cópias da região central repetida e o domínio C terminal da CSP de *P. falciparum* fusionados ao antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) (Kaslow & Biernaux, 2015). A RTS,S, formulada com o potente adjuvante lipossomal AS01 da GlaxoSmithKline é a única vacina que tem demonstrado eficácia protetora contra a malária ocasionada por *P. falciparum* em ensaio clínicos de fase III. Embora a proteção seja parcial e diminua com o tempo, esta parece depender da idade; em crianças de 6 – 12 semanas a proteção foi mais baixa que naquelas de 5 – 17 meses, tendo recebido este último grupo 3 doses da vacina seguindo um esquema de 0, 1 e 2 meses. Nas crianças mais velhas (5 – 17 meses), a incidência da malária clínica foi reduzida 51% durante o acompanhamento do primeiro ano após a terceira dose, e a proteção depois de 48 meses foi de 26%. No grupo que recebeu uma quarta doses 18 meses depois da terceira dose a eficácia aumentou para 39% (RTS, 2015).

Devido ao aceite da RTS,S /AS01 pelas autoridades reguladoras europeias, a Organização Mundial da Saúde em 2015 recomendou a realização de um piloto para avaliar a possibilidade de incluir as 4 doses no esquema de vacinação, o que é importante para estimar o

potencial desta formulação na redução da mortalidade infantil e fornecer dados adicionais sobre segurança no contexto do uso rotineiro, aspectos que ainda estão sendo avaliados.

Dado que a **CSP** tem sido amplamente estudada em *P. falciparum* e outras espécies de *Plasmodium*, esta proteína é considerada um alvo potencial para desenhar vacinas contra *P. vivax*. A diferença da CSP de *P. falciparum* para a CSP de *P. vivax* é que esta última apresenta três variações alélicas identificadas como VK210, VK247 e *vivax-like* CSP, as quais diferem na região repetida (Rosenberg et al., 1989). A variante VK210 tem uma grande distribuição global, sendo encontrada no Brasil, Índia, Tailândia e Peru; enquanto que VK247 é encontrada em algumas regiões da Colômbia e do Brasil; *vivax-like* já foi encontrada na Indonésia, Madagascar e Papua Nova Guiné (López et al., 2017). Em estudos de antigenicidade de pessoas expostas à infecção em diferentes regiões endêmicas, se encontrou uma alta prevalência de indivíduos que respondem a diferentes fragmentos da PvCSP (Herrera et al., 2004). Estudos em fase pré-clínica e ensaios clínicos de fase I tem sido feitos com peptídeos sintéticos longos baseados na região N-terminal, C-terminal e região repetida da PvCSP, unidos ao peptídeo do toxóide tetânico (Herrera et al., 2004). Primatas não humanos imunizados produzem anticorpos específicos que reconhecem os peptídeos longos e a CSP desde a primeira imunização (Herrera et al., 2004). Fragmentos imunogênicos da CSP têm sido avaliados na vacina recombinante VMP 001, a qual foi expressa em *Escherichia coli* e codifica uma quimera da CSP (Bell et al., 2009). A VMP 001 desencadeia uma forte resposta imune em camundongos da linhagem BALB/c, e estes anticorpos são capazes de aglutinar esporozoítos vivos e mostram uma alta reatividade específica contra as variantes VK210 e VK247 (Cheng et al., 2013). Os resultados da fase I e II da VMP001/AS01B mostraram que a vacina induz resposta de anticorpos, resposta imune mediada por células e retarda o período latente, mas não gera uma proteção estéril (Bennett et al., 2016). Grupos brasileiros também desenvolveram uma vacina baseada na PvCSP, que consiste numa proteína recombinante de fusão de porções dos três alelos circulantes da PvCSP expressa em leveduras. Imunizações com formulações baseadas nesta vacina conferiram proteção parcial em camundongos desafiados com parasitos murinos expressando a PvCSP (De Camargo et al., 2018).

Além destes, também está em teste o candidato vacinal **ChAd63 ME-TRAP/MVA ME-TRAP**, contra o *P. falciparum*, composto por dois vetores virais ChAd63 (Adenovírus de chimpanzé sorotipo 63) e MVA (Modified vaccinia virus Ankara) ambos expressando o inserto de fita multi-epítotos ME-TRAP (Thrombospondin-Related Adhesion Protein linked to a multi-epitope strain) (Mcconkey et al., 2003). A vacinação heteróloga, que inicia com a

imunização com a subunidade ChAd63 ME-TRAP e 6 semanas depois o reforço é feito com a MVA ME-TRAP, tem mostrado uma eficácia estéril parcial de 20 – 25% contra a infecção de *P. falciparum* na fase IIa, e esta mesma formulação reduziu o risco de infecção em 67% num ensaio clínico com adultos no Quênia (Ewer et al., 2013; Ogowang et al., 2015).

Um aspecto chave e que se torna um desafio no desenvolvimento de vacinas que previnem a infecção, é a alta frequência de haplótipos variáveis em campo das moléculas nas quais as vacinas estão sendo baseadas. No caso da CSP, já foi observado mediante análise de sequenciamento de DNA de parasitos dos ensaios da RTS,S, que a frequência do haplótipo vacinal 3D7 pode variar através dos lugares de estudo na África (Neafsey et al., 2015). Estes resultados enfatizam que a variação nos parasitos pode limitar a eficácia das vacinas para malária e ressalta o potencial destas variantes dos parasitos para evadir o efeito vacinal e continuar se transmitindo (Coelho et al., 2017)

2.5.2 Vacinas de estágios sanguíneos

As vacinas de estágios sanguíneos têm por objetivo prevenir a doença mas não necessariamente prevenir a infecção. A ideia de adquirir uma proteção gradual contra a forma clínica da malária, como acontece naturalmente nas áreas endêmicas, é a estratégia utilizada com este tipo de vacina. Esta proteção gerada durante o ciclo eritrocítico é principalmente mediada por anticorpos neutralizantes contra antígenos expressos sobre a superfície dos merozoítos e hemácias infectadas. Os alvos desta resposta são considerados candidatos vacinais. Dentre os alvos identificados e testados em ensaio de vacinação encontram-se a MSP1 (Merozoite Surface Protein 1) e AMA1 (Apical Membrane Antigen 1) (Ouattara & Laurens, 2015; Sabchareon et al., 1991).

Nos últimos anos, a vacina de subunidade contra **AMA1-RON2L** tem gerado resultados promissores em induzir proteção. O antígeno AMA1 isoladamente não gera proteção em ensaios de infecção por malária controlada em humanos, apesar de estudos em campo sugerirem que a vacina AMA1 confere atividade contra parasitos homólogos (Thera et al., 2011). AMA1 forma um complexo com a proteína RON2 durante a invasão dos eritrócitos. Estudos recentes mostraram que anticorpos contra o complexo AMA1-RON2 protegem contra a infecção pelo *P. yoelii* em camundongos e controla o crescimento de estágios sanguíneos de *P. falciparum* no macaco *Aotus* (Srinivasan et al., 2017). Atualmente, alguns estudos em ratos estão sendo desenvolvidos para avaliar vacinas multi-alélicas de AMA1-RON2 com o objetivo de induzir

proteção contra um número significativo de cepas de *Plasmodium falciparum* (Coelho et al., 2017).

O estudo do antígeno RH5 de *P. falciparum* também tem obtido progresso em bloquear a invasão do eritrócito e prevenir a infecção dos estágios sanguíneos. *Pf*RH5 foi identificado como um alvo altamente conservado no merozoíto e pode ser suscetível a anticorpos neutralizantes induzidos pela vacina (Douglas et al., 2011). Estudos pré-clínicos desenvolvidos em primatas não humanos (Macacos do gênero *Aotus*) mostraram que a vacina *Pf*RH5 induz resposta de anticorpos e confere proteção contra cepas de *P. falciparum* com diferentes níveis de virulência (Douglas et al., 2015). A primeira geração da vacina *Pf*RH5 está sendo testada em ensaios clínicos em Oxford e Tanzânia; estudos para melhorar a formulação vacinal envolvem a identificação de epítomos críticos na *Pf*RH5, incorporação do imunógeno *Pf*RH5 em partículas virais e a manufatura do produto vacinal utilizando células de linhagem de *Drosophila* estão sendo desenvolvidos (Hjerrild et al., 2016; Wright et al., 2014).

A respeito de vacinas de estágios sanguíneos que estejam sendo desenvolvidas para *P. vivax*, a proteína DBP (Duffy-binding protein) é um dos principais alvos devido à sua importância durante a fase assexuada do parasita na corrente sanguínea, já que a *Pv*DBP é necessária para a invasão de reticulócitos humanos mediante a interação com o receptor DARC (Duffy antigen receptor for chemokines) (Miller et al., 1976). A *Pv*DBP se localiza nos micronemas e sua capacidade para induzir a formação de anticorpos contra parasitos de estágios sanguíneos já foi comprovada (Ntumngia & Adams, 2012). Vacinas estão sendo testadas em estudos clínicos contra a *P. vivax* baseadas neste antígeno. A formulação *Pv*DBP/II/GLA-SE é baseada na região conservada rica em cisteína da *Pv*DBP em combinação com o adjuvante GLA-SE (Glucopyranosyl Lipid Adjuvant-Stable Emulsion), um agonista sintético de receptores tipo Toll. Estudos com esta formulação têm mostrado que a vacina desencadeia altos títulos de anticorpos anti-*Pv*DBP/II que bloqueiam com eficiência a ligação de diferentes alelos de *Pv*DBP/II ao receptor (Wiley et al., 2011). Ensaios clínicos de fase I, mostraram que a vacina é imunogênica e segura em adultos, e que os anticorpos gerados bloqueiam a união de *Pv*DBP/II ao receptor DARC em ensaios *in vitro*; o que dá suporte ao desenvolvimento de ensaios clínicos para avaliar a eficácia desta formulação (Singh et al., 2018).

Os obstáculos no desenvolvimento de vacinas contra estágios sanguíneos incluem polimorfismo antigênico tanto do merozoíto como das proteínas de superfície do eritrócito infectado, assim como as dificuldades na correta expressão conformacional das proteínas. Estudos sugerem que altas concentrações de anticorpos são necessárias para controlar a invasão

dos merozoítos *in vivo* e muitos ensaios têm falhado em induzir altos títulos de anticorpos e, assim, proteção em humanos. Estudos para melhorar a imunogenicidade e a atividade funcional das vacinas contra antígenos de fase sanguínea continuam. Novos antígenos, assim como novas combinações de antígenos, podem dar uma atividade aditiva ou sinérgica e portanto são uma prioridade na pesquisa de vários grupos (Coelho et al., 2017) .

2.5.3 Vacinas de Bloqueio da transmissão

Uma das possíveis estratégias no controle da malária é combater a dispersão do parasito. Com essa premissa é que foram pensadas as vacinas de bloqueio da transmissão (TBV: Transmission Blocking Vaccines). As TBVs têm como alvo estágios sexuais, buscando a redução do número de mosquitos infectados e, portanto, menos transmissão da malária na população. Estas vacinas também são conhecidas como vacinas altruístas, já que não beneficiam diretamente a pessoa vacinada (Hoffman et al., 2015). TBVs são especialmente atrativas em campanhas para eliminação da malária de uma área determinada, já que também podem ter um papel relevante da redução da dispersão de parasitos resistentes a medicamentos e provenientes de pacientes assintomáticos com parasitemias submicroscópicas (Draper et al., 2018).

O sucesso das TBVs depende da capacidade de induzir uma resposta de anticorpos neutralizantes contra os estágios sexuais do *Plasmodium*, desde gametócitos até o oocinetos, bloqueando a infecção do mosquito vetor (Matuschewski & Mueller, 2007). A eficácia das TBVs pode ser medida por ensaios de alimentação direta de mosquitos *Anopheles* sobre humanos ou em ensaios de alimentação por membrana artificial (MFA: Membrane Feeding Assay) com sangue humano. Nesses ensaios, o efeito do soro, plasma ou anticorpos dos indivíduos imunizados é comparado com um grupo controle naïve e os efeitos medidos pela redução da densidade de oocistos no intestino dos mosquitos analisados (Vallejo et al., 2016). Atualmente, os antígenos mais estudados e que estão presentes em gametócitos e oocinetos são P48/45, P25/28 e P230, sendo testados em ensaios de vacinação tanto contra *P. vivax* como *P. falciparum*.

A **Pfs48/45** é expressa em gametócitos. Esta proteína dá início à diferenciação sexual no humano e tem um papel crítico na fertilidade do gameta masculino (Van-Dijk et al., 2001). A P48/45 faz parte de uma família de proteínas definidas pela presença de motivos conservados com seis resíduos de cisteína que fazem ligação dissulfeto e pela ancoragem a

glicofosfatidilinositol (GPI: glycosylphosphatidylinositol) (Roeffen et al., 1995). O domínio C-terminal da *Pf48/45*, contém um epítipo I de células B que é o principal alvo da resposta de anticorpos com atividade bloqueadora (Outchkourov et al., 2007). Há, no entanto, um grande desafio em produzir a *Pf48/45* como proteína recombinante com estrutura correta de modo que consiga gerar imunidade bloqueadora da transmissão (TBI: transmission blocking immunity). Diferentes tentativas com uma variedade de plataformas de expressão que incluem *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* já foram testadas. No entanto, estes produtos recombinantes ou não foram produzidos ou estavam com estrutura incorreta, e por tal motivo não induziram TBI (Milek et al., 1998, 2000). Mais recentemente, resultados promissores que correspondem ao correto enovelamento e funcionalidade de um fragmento da *Pfs48/45* (159 – 428) (R0.10C) fusionado a um antígeno de estágios sexuais rico em glutamato foi expresso em *Lactococcus lactis*. Este antígeno quimérico em combinação com o adjuvante Alum induziu anticorpos em ratos com uma forte atividade bloqueadora (Theisen et al., 2014). Atualmente, os estudos relacionados à *Pfs48/45* têm focado no entendimento das funções biológicas, aquisição de imunidade natural, atividade funcional de anticorpos específicos, diversidade de sequências, produção de proteínas recombinantes e estudos de vacinação; de modo que os resultados obtidos destes estudos sugerem sua futura avaliação em ensaios clínicos (Theisen et al., 2017).

A *Pfs230* e a *Pfs48/45* fazem parte dos antígenos de pré-ativação de gametócitos mais estudados até hoje. A *Pfs230* consiste numa proteína de 230 kDa (a qual deve seu nome) que é expressa na superfície de gametócitos e faz parte de uma família de proteínas com estrutura de motivos de cisteína conservados e pareados com um domínio duplo rico em cisteínas delimitadas por ligações dissulfeto (Carter et al., 1995). Com aparente ausência de GPI, a *Pfs230* é expressa num complexo estável com *Pfs48/45* sobre a membrana do gametócito (Carter et al., 1995). Uma vez que estas formas parasitárias são ativadas e transformadas em gametas, a *Pfs230* se torna rapidamente acessível sobre a membrana podendo ser reconhecida por anticorpos específicos. Algo interessante dos anticorpos anti-*Pfs230*, é que sua atividade bloqueadora, medida mediante SMFA (Standard Membrane Feeding Assay), foi incrementada pela presença de complemento humano (Read et al., 1994). A *Pfs230* apresenta uma alta complexidade em sua estrutura de modo que não se tem conseguido expressar a totalidade de sua sequência. O fragmento C da *Pfs230* (resíduos 443–1132) contém epítopos reconhecidos por anticorpos neutralizantes que permitem reduzir parcialmente a transmissão (Williamson, Keister, Muratova, & Kaslow, 1995). Já uma porção menor do domínio 3 de *Pfs230* (resíduos

444-730), produzido em um sistema de expressão em plantas, induziu atividade bloqueadora total na presença de complemento, qualificando-a como potencial candidato a TBV para testes clínicos (Farrance et al., 2011).

Além destes dois antígenos, há o antígeno *Pfs25*, que é uma proteína de 25kDa liberada abundantemente sobre a superfície de zigotos e oocinetos. Esta proteína é caracterizada pela presença de um C-terminal de ancoragem por GPI seguido de 4 domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF: epidermal growth factor) com 22 cisteínas e 11 ligações dissulfeto (Kaslow et al., 1988). A proteína é liberada na membrana do parasito e possivelmente está envolvida na adesão do oocineto e subsequente penetração no intestino do mosquito (David C. Kaslow et al., 1988). Proteínas recombinantes de *Pfs25* e seu ortólogo *Pvs25*, expressas em leveduras, têm sido testadas em ensaios clínicos na formulação conhecida como TBV25H/Alum (chamada também *Pfs25H*). No primeiro ensaio clínico de fase 1, a *Pfs*-TBV25H/Alum desencadeou baixos títulos de anticorpos e posteriormente os SMFA foram insatisfatórios (Kaslow & Shiloach, 1994). No segundo ensaio clínico, *Pfs*-TBV25H/Alum foi utilizado como reforço da segunda dose, enquanto a primeira dose foi feita usando um vetor multi-antígeno da *Pfs25*-NYVAC-Pf7, o qual resultou numa redução de 75% de oocistos nos ensaios de SMFA (Kaslow & Shiloach, 1994). Diferentes propostas para resolver o problema relacionado com a homogeneidade e integridade conformacional, assim como para incrementar a imunogenicidade da *Pfs25*, têm sido avaliadas. Isto inclui: expressão da *Pfs25* com códons harmonizados para *E. coli* (Kumar et al., 2014); produção da *Pfs25* usando cloroplastos de algas (Gregory et al., 2012); fusão da *Pfs25* aos vetores virais ChAd63 e MVA (Kapulu et al., 2015); fusão da *Pfs25* a nanopartículas IMX313 (Li et al., 2016), fusão da *Pfs25* a uma liquenase modificada (LicKM) expressada na planta *Nicotiana benthamiana* (Jones et al., 2015); e a fusão da *Pfs25* num complexo de proteínas de membrana de *Pseudomonas aeruginosa*.(Kubler-Kielb et al., 2007); todas estas combinações permitiram a obtenção de uma potente TBA em estudos de imunização. Atualmente, os candidatos *Pfs25/Pvs25* conjugados a EPA (ExoProteinA), em combinação com os adjuvantes Alhydrogel e AS01, têm avançado para sua avaliação na administração individual ou em coadministração com outros antígenos como a P230 (Dumbo et al., 2018).

Além de melhorar a eficiência das formulações com os candidatos vacinais já descritos, a identificação e caracterização de novos alvos é fundamental para progredir nesta área, visto as limitações apresentadas pelos candidatos descritos (Wu et al., 2015).

2.6 Merozoite Thrombospondin-Related Anonymous Protein

A MTRAP é uma molécula expressa inicialmente na superfície de merozoítos de *P. falciparum*, identificada por Baum e colaboradores em 2006. O gene da MTRAP é conservado e sintênico entre as espécies de *Plasmodium* e a proteína é localizada nos micronemas do merozoíto. O gene da *PfMTRAP* é predito para codificar uma proteína de 498 aminoácidos com uma predição de massa molecular de 58 kDa. A análise de BLASTP e TBLASTN identificou o ortólogo da *PfMTRAP* em *P. berghei* com 35% de identidade (Baum et al., 2006). De acordo com a base de dados PlasmoDB, a *PbMTRAP* apresenta uma sequência predita de 618 aminoácidos e uma massa molecular de 66,778 kDa, com um ponto isoeletrico de 4.5 (PlasmoDB). A MTRAP faz parte da família TRAP, um grupo de proteínas chaves envolvidas no complexo motor de actina de apicomplexos (Baum et al., 2006).

Os apicomplexos carecem de estruturas de motilidade clássica como cílios ou flagelos (com exceção dos gametas masculinos, que são flagelados). Em vez disso, eles se movimentam por uma única forma de locomoção baseada na utilização de moléculas de actina, chamada motilidade tipo *gliding* (Morrissette & Sibley, 2002). A eficiente motilidade e subsequente invasão celular precisa da liberação de proteínas desde as organelas secretoras localizadas no complexo apical, estrutura que define o filo. Estas organelas, os micronemas, róptrias e grânulos densos, contém muitas das proteínas chaves necessárias para direcionar a adesão, invasão celular e estabelecimento do vacúolo parasitóforo (Carruthers & Sibley, 1997).

A família TRAP (thrombospondin-related anonymous protein) é um grupo de proteínas relacionadas com a proteína do mesmo nome, TRAP, que é a primeira proteína a ser descrita como proteína transmembranar de tipo I encontrada em apicomplexos (Ménard, 2001). Esta família se caracteriza pela presença de um domínio citoplasmático ácido que contém um resíduo de triptofano conservado e múltiplas cópias dos domínios adesivos extracelulares, domínio A e domínio TSR (Thrombospondin type-I repeat) (Figura 6) (Kappe et al., 1999). No *Plasmodium*, a proteína TRAP expressa em esporozoítos e a CTRP em oocinetos estão entre as proteínas de *Plasmodium* mais estudadas. Enquanto a TRAP tem um único domínio adesivo A e um único TSR, a CTRP apresenta múltiplos domínios A e TSR (Trottein et al., 1995). Já a MTRAP difere das duas anteriormente mencionadas porque não possui domínio A na sua estrutura (Figura 6) (Baum et al., 2006).

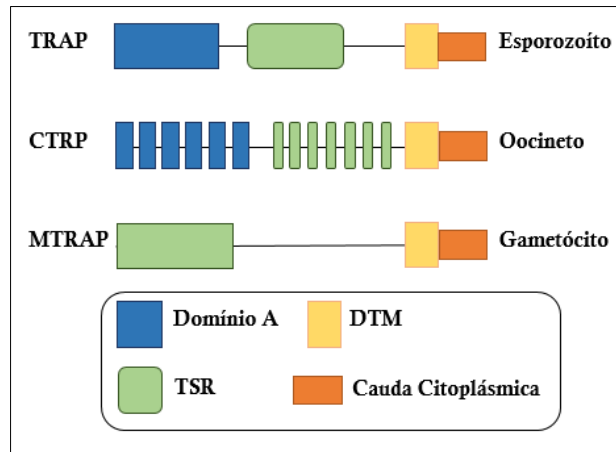


Figura 6. Representação gráfica da estrutura de proteínas da família TRAP em *Plasmodium*. TRAP: Thrombospondin-related adhesive protein; CTRP: Circumsporozoite and TRAP-related protein; MTRAP: Merozoite Thrombospondin-Related Anonymous Protein. As caixas de cores representam os domínios que compõem as proteínas. Caixa azul: Domínio A ou fator de Von Willebrand. Caixa verde: Domínio TSR (Thrombospondin type-I repeat). Caixa Amarela: Domínio transmembranar. Caixa laranja: Cauda citoplásmica. Adaptado de Bargieri et al., 2016.

A TRAP tem um papel biológico no *gliding* do esporozoíto ao se unir ao motor actina-miosina através do domínio citoplasmático, além de se ligar ao substrato por interação com o domínio extracelular e mediante o TSR e o domínio A (Ménard, 2000). A TRAP é redistribuída desde o micronema à superfície do esporozoíto e posteriormente clivada por uma protease tipo romboide (Baker et al., 2006). Estudos em *P. berghei* demonstram que parasitos com alteração no gene TRAP desenvolvem oocistos normais, mas os esporozoítos são imóveis e com capacidade muito reduzida de infectar células (Sultan et al., 2001, 1997).

A CTRP é expressa no oocíneto e é associada com o micronema do oocíneto amadurecido durante seu movimento desde o espaço endoperitrófico à lâmina basal do epitélio do intestino (Templeton et al., 2000). Esta proteína é mais abundante no lugar de contato entre a terminação apical do oocíneto e a lâmina basal da célula epitelial, indicando sua função como molécula de adesão que promove o movimento para penetrar o lúmen e o epitélio, e a associação do oocíneto com a lâmina basal do intestino para sua transformação em oocisto (Limviroj et al., 2002). Observações feitas em parasitos *P. berghei* CTRP mutantes, cujos oocínetos apresentavam motilidade reduzida e incapacidade de invasão do epitélio do intestino de mosquito, demonstraram que a CTRP é essencial para a infectividade do oocíneto e consequente transmissão ao mosquito (Dessens et al., 1999).

A respeito da TRAP de merozoíto, foi reportado que o *knock-out* do gene da MTRAP em *P. falciparum* não seria possível (Baum et al., 2006), levando à conclusão de que a MTRAP estaria envolvida no processo de invasão do eritrócito pelo merozoíto. A partir de abordagens

bioquímicas, foi encontrado que o ectodomínio da MTRAP de *P. falciparum* se liga à semaphorin-7A (CD108) na superfície do eritrócito humano (Bartholdson et al., 2012). Nesta interação, dois monômeros da MTRAP interagem com o domínio Sema de um homodímero da semaphorin-7A. Finalmente, foi mostrado que a cauda citoplasmática da MTRAP parece ser suficiente para polimerizar actina (Diaz et al., 2014). Todos esses dados favorecem a visão de que a MTRAP estaria envolvida na invasão dos eritrócitos pelo merozoíto, possivelmente atuando como ponte entre o motor de actina do parasito e a superfície do eritrócito.

Mais recentemente, usando genética reversa em *P. berghei*, demonstrou-se que o *knock-out* da MTRAP não tem impacto no crescimento de estágios assexuados de *P. berghei* e *P. falciparum*, mas bloqueia completamente a transmissão do parasito ao mosquito (Bargieri et al., 2016). Também foi possível demonstrar que a MTRAP não se encontra só na superfície de merozoítos, mas que também é expressa na superfície dos gametócitos e gametas de *P. berghei* e *P. falciparum* (Bargieri et al., 2016). É assim que foi possível concluir que MTRAP é dispensável para o desenvolvimento do merozoíto, mas tem um papel crucial na fase sexual de *Plasmodium*, e pode representar um novo antígeno de bloqueio da transmissão (Bargieri et al., 2016).

3 JUSTIFICATIVA

Apesar da redução global do número de casos na atualidade, a malária continua sendo a mais importante doença parasitária no mundo. De acordo com dados da WHO, foram estimados aproximadamente 219 milhões de casos de malária e 435,000 mortes em 2017 (WHO, 2018). No Brasil, houve um aumento de 47% no número de casos em 2017 em relação a 2016 (Conn et al., 2018).

A necessidade de se eliminar a malária é cada vez mais urgente, já que foi detectado aumento da resistência dos parasitos aos antimaláricos (Dondorp et al., 2009). A resistência a drogas é um dos principais obstáculos para o controle da malária. Uma dispersão de parasitos resistentes à artemisinina pode ser catastrófica, como foi no caso da dispersão da resistência à cloroquina da Ásia para a África na metade do século XX. Portanto, novas ferramentas de controle são urgentes para se conseguir eliminar a malária, especificamente aquelas que interrompem a transmissão da doença.

Dentro das estratégias que interrompem a transmissão do *Plasmodium*, a ideia de uma formulação vacinal baseada em moléculas de superfície envolvidas na fase sexual do parasito está tomando cada vez mais força na pesquisa (malERA, 2017a).

Nesse contexto, propomos o estudo da MTRAP, uma proteína presente nas espécies de importância em saúde pública como *P. falciparum* e *P. vivax*, e nos modelos de malária murina como o *P. berghei*, como um possível antígeno de bloqueio de transmissão. A importância da MTRAP na fase sexual sanguínea faz desta proteína um interessante alvo de estudo. A hipótese deste estudo é que anticorpos gerados contra a *PbMTRAP* tem um efeito bloqueador da fertilização de *P. berghei*.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Testar a capacidade de anticorpos anti-*PbMTRAP* de inibir a fertilização *in vitro* de gametócitos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a imunogenicidade da *rPbMTRAP* em camundongos da linhagem BALB/c ou C57BL/6 e produzir anticorpos policlonais anti-*PbMTRAP in vivo*.
- Testar o potencial dos anti-*PbMTRAP* para reconhecer a proteína nativa.
- Testar a atividade bloqueadora dos anticorpos na formação de oocinetos *in vitro*.

5 METODOLOGIA

5.1 Material biológico - Modelo murino de malária

5.1.1 Camundongos e parasitos *P. berghei*

Para o desenvolvimento do presente projeto, camundongos de 4 semanas de idade das linhagens BALB/c e C57BL/6, foram usados seguindo as diretrizes da comissão de ética no uso de animais do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), protocolo N° 85/2017-CEUA. Os animais foram fornecidos pelos biotérios de criação e experimentação do Departamento de Parasitologia do ICB e biotério central da Faculdade de Medicina da USP.

O parasito da malária murina *P. berghei*, cepa ANKA, foi originalmente obtido do Instituto Pasteur, Paris, França. O parasito foi mantido no laboratório de genética molecular do ICB-USP por combinação de passagens entre camundongos BALB/c e armazenamento criogênico.

As infecções dos camundongos foram feitas por injeção intraperitoneal (ip) de 150 µl de sangue infectado criopreservado a -80 °C. As parasitemias e gametocitemias dos animais, avaliadas em esfregaço corado com panótico rápido, foram calculadas como a porcentagem de hemácias infectadas.

5.2 Obtenção da *PbMTRAP* recombinante (*rPbMTRAP*)

5.2.1 Estratégia de clonagem da rPbMTRAP

A sequência de 536 aminoácidos do ectodomínio da MTRAP de *P. berghei* (código de acesso no plasmDB PBANKA_0512800 merozoite TRAP-like protein), com otimização de códons para *E. coli* e fusionado a um tag de hexa-histidina, foi clonada no vetor de expressão pET28a+ (fornecido por GenScript) (Figura 7).

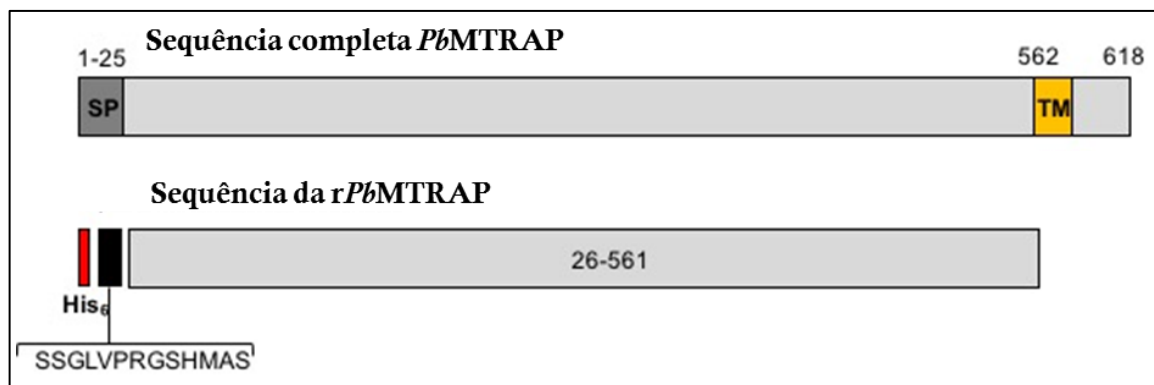


Figura 7. Estratégia para obtenção da proteína recombinante *PbmTRAP*. Ilustração da sequência completa da *PbmTRAP*. (SP: Signal peptide; TM: Transmembrane domain) e a sequência expressa como proteína bacteriana recombinante fusionada a uma cauda de hexa-histidina.

5.2.2 Expressão e purificação da *PbmTRAP* recombinante (*rPbmTRAP*)

Bactérias *E. coli* (BL21) foram transformadas mediante choque térmico a 42 °C com o plasmídeo pET28a+_*PbmTRAP*. A proteína foi expressa a 37 °C em agitação durante 4 horas após indução com 0,1 mM de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Para a purificação da proteína recombinante, o precipitado das bactérias foi ressuspensionado em buffer de lise (56 mM de NaH₂PO₄ e 128 mM de NaCl (pH 7.0), 1 mM de PMSF e 0,2 mg/ml de lisozima), e depois submetido a sonicação (12 ciclos de 30 segundos de pulsos com intervalos de 40 segundos e intensidade de 10 %). A fração solúvel da *rPbmTRAP* foi purificada por afinidade em coluna de Níquel (Ni-NTA agarose, QUIAGEN) e eluída com imidazol 0,5 M (pH 6.0), depois de lavar com 1000 ml de buffer (56 mM de NaH₂PO₄; 128 mM de NaCl; 1.080 mM de glicerina; pH 6.0). Posteriormente, o conjunto das frações que contêm a proteína foi dialisado contra tampão fosfato salino (PBS: Phosphate Buffered Saline, pH 7,4) em agitação durante toda a noite a 4°C e depois analisado em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

5.3 Análise da proteína recombinante

5.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A *rPbmTRAP* foi analisada mediante SDS-PAGE. 4 μ g da amostra foi misturada com agente redutor e logo fervida a 100 °C por 7 minutos. A amostra foi separada a 100 V em gel de acrilamida 10 % posteriormente corado com coomassie blue.

5.3.2 Western Blot anti-Histidina

Dos microgramas do rPbMTRAP foram separados em SDS-Page 10% de acrilamida em condições redutoras. A proteína foi transferida à membrana de nitrocelulose a 100 V por duas horas. Após a transferência, a membrana foi colocada em solução de bloqueio (PBS-Tween 0,05 % - leite 5 %) por duas horas. O anticorpo primário (anti-histidina) foi diluído na solução de bloqueio em proporção 1:2000 e a membrana foi incubada com o anticorpo overnight a 4 °C. Depois da realização das lavagens, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário Goat anti-Mouse-HRP (1:2000). A revelação foi feita com o substrato (Supersignal West pico) e observado no ChemiDoc.

5.4 Imunização de camundongos

5.4.1 Adjuvantes

- **Adjuvante incompleto de Freund (Incomplete Freund's adjuvant IFA, SIGMA)**

IFA é um dos adjuvantes mais comumente usados em pesquisa. Este corresponde a um preparado de óleos não metabolizáveis (óleo de parafina e monooleato manítico). IFA não contém *Mycobacterium tuberculosis* inativado, como é encontrado no Adjuvante completo de Freund (CFA: Complete Freund's Adjuvant) e portanto é menos inflamatório. IFA induz predominantemente uma resposta Th2 através da formação de um depósito no local de injeção e a estimulação de células plasmáticas produtoras de anticorpos (Invivogen, 2019a).

- **Poly (I:C) de alto peso molecular (Polyinosinic-polycytidylic acid High molecular weight) Poly (I:C) (HMW), InvivoGen**

Poly (I:C) é um análogo sintético de RNA de dupla fita (dsRNA), com atividade de padrão molecular associado a patógeno (PAMPs: Pathogen-associated molecular patterns), que pode ativar múltiplos elementos da defesa do hospedeiro em um padrão que se assemelha ao de uma infecção viral. Poly(I:C) estimula elementos da resposta imune inata e adaptativa, ativando receptores de reconhecimento de padrões (PRR: pattern-recognition receptor) como os TLR3 (Toll-like receptors tipo 3) e RLR (RIG-I-Like receptor), através dos quais o adjuvante induz uma forte resposta de interferon; expressão de citocinas, quimiocinas e fatores co-estimuladores; e a ativação de proteína quinase R (PKR) e outros sistemas dependentes de dsRNA (Martins et al., 2015).

Poly (I:C) (HMW) de InvivoGen, compreende uma longa fita de polímeros de inosina Poly (I), ligados a uma fita de homopolímeros de citidina Poly (C). O tamanho médio do Poly (I:C) (HMW) é de 1,5 Kb a 8 Kb (Invivogen, 2019b).

5.4.2 Desenho experimental com anticorpos purificados

Para obter anticorpos policlonais, 8 camundongos fêmeas BALB/c, foram imunizados 3 vezes via subcutânea com 10 µg da rPbMTRAP em combinação com adjuvante incompleto de Freud (IFA: Incomplete Freund's adjuvante, SIGMA). Intervalos de 3 semanas foram mantidos entre cada imunização. Um grupo controle negativo de 8 camundongos foi imunizado com PBS e a mesma formulação de adjuvante do grupo experimental, seguindo o mesmo esquema de imunizações (Figura 8A). 7 dias depois da última imunização (dia 50), sangue dos camundongos (100 – 200 µL aproximadamente), foi obtido por punção da veia maxilar e o soro foi separado por centrifugação a 15000 rpm/10 minutos a 4 °C para os testes de imunogenicidade por ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). No dia 58, os camundongos foram sacrificados e o soro total foi armazenado a -20 para posteriormente fazer a purificação de anticorpos.

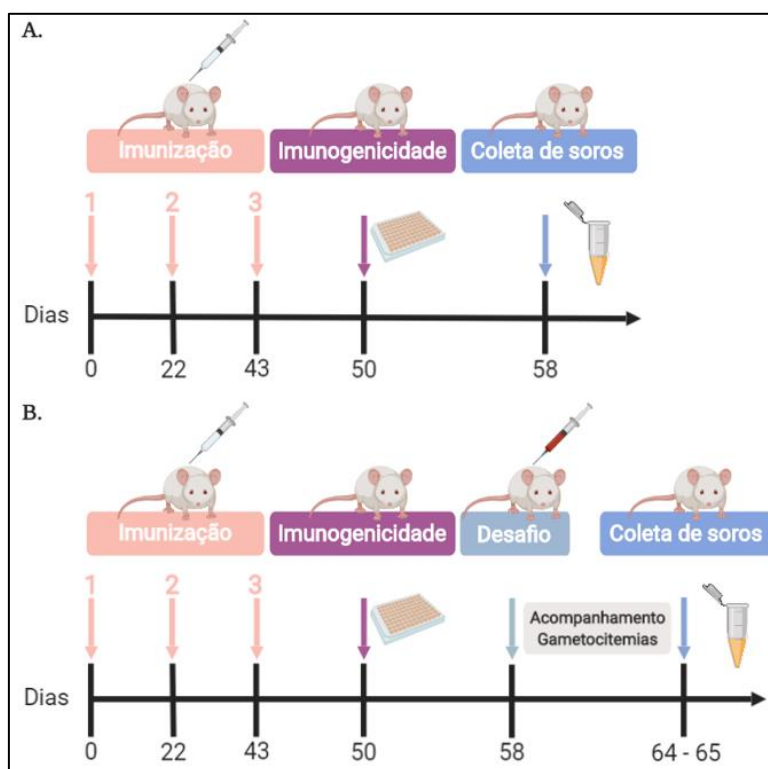


Figura 8. Esquema de imunização de camundongos. **A.** Estratégia para obtenção de anticorpos purificados. **B.** Estratégia para realização de ensaios com camundongos imunizados e depois desafiados.

5.4.2 Desenho experimento com anticorpos não purificados

Para avaliar o efeito de anticorpos anti-*PbMTRAP* não purificados sobre a formação de oocinetos, 6 camundongos fêmeas BALB/c, foram imunizados 3 vezes via subcutânea com 10 µg da *rPbMTRAP* em combinação com 50 µg de Poly (I:C) (InvivoGen); outros dois grupos receberam 2 e 3 doses do recombinante. Intervalos de 3 semanas foram mantidos entre cada imunização. Dois grupos controle negativo de 6 camundongos foram injetados com PBS e PBS-Poly (I:C) com a mesma formulação de adjuvante que no grupo experimental, seguindo o mesmo esquema de imunizações (Figura 8B). 7 dias depois da última imunização (dia 50), sangue dos camundongos (100 – 200 µL aproximadamente), foi obtido por punção da veia maxilar e o soro foi separado por centrifugação a 15000 rpm/10 minutos a 4 °C para os testes de imunogenicidade por ELISA. Duas semanas depois da última imunização (Dia 58), os camundongos de todos os grupos foram desafiados com 5.000 formas assexuadas do parasito *Ookluc*, e a parasitemia e gametocitemia foi seguida por microscopia. Quando a gametocitemia chegou a 0,4 %, um ensaio de conversão foi feito para testar a atividade bloqueadora da formação de oocinetos dos anticorpos circulantes em cada camundongo (Figura 8B).

5.5 Teste de imunogenicidade por ELISA

Os títulos de anticorpos anti-*PbMTRAP* foram medidos por ELISA depois da última imunização, e foi utilizado o protocolo descrito previamente por Bargieri e colaboradores em 2010, como é detalhado a seguir:

Sensibilização: Placas de 96 poços (Costar High Binding) foram sensibilizadas durante 12 – 14 horas com a proteína *rPbMTRAP*. A *rPbMTRAP* foi diluída em PBS 1X (pH 7,4) e 50 µL da diluição foram colocados por poço (100 ng/poço) e incubados a temperatura ambiente.

Bloqueio: Após retirar o excesso de antígeno por inversão, 3 lavagens das placas com PBS-Tween 0,02 % foram feitas. O bloqueio da placa foi feito com a solução PBS-Tween 0,02 % - BSA 1 % (Bovine Serum Albumin) com 5 % de leite em pó desnatado. 200 µL da solução de bloqueio foi colocada por poço e a placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 0,02 %.

Anticorpo primário: Diluições seriadas dos soros (grupo experimental e controle) foram testadas partindo de 1:200 até 1:3542944; estes foram diluído em PBS-Tween 0,02 % - BSA 0,25 % - 5 % de Leite. 100 µL de cada diluição foi colocada na placa e esta foi incubada

a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 0,02 %.

Anticorpo secundário: O anticorpo secundário Goat anti-mouse IgG conjugado à peroxidase (Southern Biotech), foi aplicado numa diluição final de 1:2000. O secundário foi diluído em PBS-Tween 0,02 % - BSA 0,25 % - 5 % de Leite. 50 µL da diluição foi colocada na placa e esta foi incubada a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 0,02 %.

Revelação: 100 µL de solução de revelação [Na_2HPO_4 0,2 M; ácido cítrico 0,2 M; OPD (fenilenodiamina) e H_2O_2 30 %, pH 4,7] foram colocados por poço e incubadas por 15 minutos. A reação foi parada adicionando-se 50 µL de H_2SO_4 4 N. A leitura foi feita em leitor de ELISA no comprimento de onda de 490 nm.

Interpretação dos resultados: Os títulos anti-*PbMTRAP* foram determinados como a última diluição com leitura de densidade ótica (DO) a 490 nm superior a 0,1.

5.6. Purificação de anticorpos

Os soros de 16 camundongos, 8 imunizados com a *rPbMTRAP* e 8 camundongos do grupo controle, foram utilizados para a purificação de anticorpos por afinidade em proteína G-sepharose. A fração total de IgG foi purificada do pool de soros de cada tratamento. 500 µl de soro diluído 1:1 em PBS 1X foi misturado com 500 µl da matriz previamente lavada com PBS 1X, e depois incubado por duas horas em agitação a 4 °C. Posteriormente, a resina que contém a amostra foi montada na coluna cromatográfica e depois lavada com PBS 1X até que estivesse limpa. Os anticorpos foram eluídos com o tampão glicina (0,1M, pH 3). As frações foram coletadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml que continham 50µl de tampão de neutralização Tris-HCl (1 M, pH 8,0). Cada fração foi quantificada, e aquelas com maior concentração de anticorpos foram juntadas para serem dialisadas e concentradas em PBS 1X usando colunas de amicon (Millipore).

5.7 Western Blot para testar os anticorpos purificados

Para a coleta dos parasitos, camundongos BALB/c foram injetados pela via intraperitoneal com 150 µl de sangue parasitado (5 – 7%). Após 4 dias, o sangue foi coletado por punção cardíaca, centrifugado, e as hemácias foram lisadas com saponina 0,15 % e os

parasitas livres lavados em PBS 1X. Os parasitos foram ressuspensos em 200 µl de PBS 1X, e depois uma alíquota do extrato foi centrifugada e ressuspensa em tampão RIPA. As alíquotas foram quantificadas por Bradford e armazenadas até seu uso. 4 µg de proteína do extrato total foram separados em SDS-PAGE 10 % de acrilamida em condições redutoras. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose a 100 V por duas horas. Após a transferência, a membrana foi posta em solução de bloqueio (TBS-Tween 0,05 % - leite 5 %) por duas horas. Os anticorpos purificados (Anticorpo primário) anti-Poly I:C e anti-*PbMTRAP*, foram diluídos na solução de bloqueio em proporção 1:200 [1,5 mg/ml]. A membrana foi incubada com os anticorpos overnight a 4 °C. Depois da realização das lavagens, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário Goat anti-Mouse-HRP (1:2000). A revelação foi feita com o substrato e observado no ChemiDoc.

5.8 Imunofluorescência de gametócitos de *P. berghei*

5.8.1 Gradiente para obtenção de gametócitos

O sangue de 5 camundongos com 5 dias de infecção, foi coletado por punção cardíaca e diluída 1:4 em meio RPMI 1640 (pH: 7,2) preaquecido a 37°C. Os gametócitos foram separados da suspensão de células em gradiente de Nycodenz 13,25% e centrifugados a 500g por 20 minutos a 37°C. A interfase que contém os gametócitos foi coletada e lavada uma vez com RPMI 1640 (450g, 10min, 7 aceleração e 5 brake a 37°C).

5.8.2 Imunofluorescência

O precipitado de gametócitos foi ressuspensado em solução fixadora (PFA-4%-Glutaraldehyde-0,0075%) por uma hora. Depois de três lavagens com PBS na centrifuga (6000 rpm/2minutos), os parasitas foram submetidos a um ciclo no cytospin (500 g) até conseguir uma quantidade de células bem espalhadas pela lâmina, e o resto dos procedimentos foram feitos sobre a mesma. Foram feitas lâminas independentes para cada anticorpo primário. Os parasitos foram permeabilizados (Triton X-100 0,1% em PBS) por 10 minutos a temperatura ambiente. O bloqueio foi feito com PBS-BSA 3% por uma hora a temperatura ambiente. Após três lavagens, os parasitos foram incubados com o anticorpo primário (anti-Poly I:C ou anti-*PbMTRAP* foram utilizados numa proporção de 1:500) por 16 horas a 4°C. Como anticorpo

secundário usamos o anti-Mouse Alexa® flúor 488 (Life Technology), o qual foi posto por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, os gametócitos foram incubados com DAPI (1:47000) por 10 minutos e lavados novamente. A montagem das lâminas foi realizada com proLong e a lamínula foi fixada com esmalte transparente para sua posterior visualização no microscópio de fluorescência.

5.9 Avaliação da capacidade bloqueadora da formação de oocinetos dos anti-PbMTRAP

5.9.1 Meio de conversão

Para imitar as condições do intestino do mosquito, no qual acontece o ciclo sexual de *Plasmodium*, utilizamos o meio de cultura que contém ácido xanturênico como indutor chave para o desenvolvimento do ciclo esporogônico. O meio de conversão/oocinetos foi utilizado como reportado por Calit e colaboradores em 2018. Este consiste numa preparação a base de RPMI 1640 (Thermo Scientific, 61870), que contém o tampão HEPES (Thermo Scientific, 15630080), uma mistura de antibióticos penicilina-estreptomicina-neomicina (PSN). (Sigma-Aldrich, P4083), hipoxantina 50 mg/L (Sigma-Aldrich, H9636) e ácido xanturênico 100 µM (Sigma-Aldrich, D120804) a um pH de 8.3 (Calit et al., 2018). A receita para a preparação é resumida na Tabela 1.

Tabela 1. Preparação do meio de conversão/oocinetos.

Componente	Quantidade
Hipoxantina	0,025 g
HEPES	15,5 ml
PSN	5 ml
Ácido xanturênico	500 µl
RPMI 1614	Até 500 ml

5.9.2 Parasitos *Ookluc*

Para o desenvolvimento dos ensaios de conversão, foram utilizados parasitos *P. berghei* transgênicos que permitem a avaliação da formação dos oocineto *ex vivo* mediante a detecção de luminescência. De acordo com Calit e colaboradores em 2018, para gerar os parasitos

Ookluc, foi usada a linhagem de *P. berghei* GIMO (Gene In/Marker Out) para inserir o cassete de expressão da nanoluciferase (nLuc; Promega), sobre controle do promotor específico para oocinetos CTRP (Figura 9).

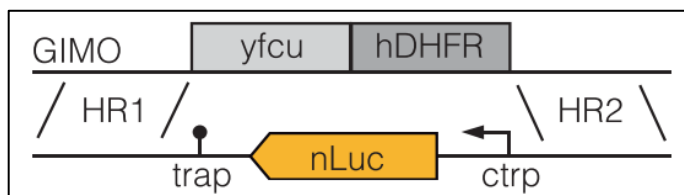


Figura 9. Estratégia para gerar os parasitos Ookluc. (Calit et al., 2018).

5.9.3 Ensaio de conversão

Para testar se anticorpos anti-*PbMTRAP* purificados podem inibir a formação de oocinetos (Figura 8A), camundongos infectados com parasitos *P. berghei* Ookluc, com gametocitemia entre 0,5 – 1 % foram usados para o ensaio de conversão. O sangue parasitado foi coletado por punção cardíaca em seringa heparinizada e depois mantido a 37 °C para impedir a ativação dos gametócitos. Em seguida, o sangue foi diluído (1:20) em meio de oocinetos contendo os anticorpos previamente diluídos. Concentrações dos anticorpos de 3,12 µg/ml a 500 µg/ml, do grupo experimental e controle foram testadas. As culturas foram incubadas a 21 °C por 24 horas, e posteriormente foi acrescentado o substrato para nanoluciferase (1:50). A formação de oocinetos foi medida por detecção da luminescência no SprectraMax i3.

A realização do ensaio de conversão com anticorpos não purificados como planejado na figura 8B foi feita com os camundongos imunizados e posteriormente desafiados com parasitos Ookluc, quando estes atingiram uma gametocitemia perto de 0,4 % (entre os dias 5 e 7) pós-desafio. Neste dia, 2 µl de sangue coletado diretamente da cauda de cada camundongo foi diluído em 20 µl de meio de oocinetos. As culturas foram incubadas a 21 °C por 24 horas e posteriormente foi acrescentado o substrato para nanoluciferase (1:50). A formação de oocinetos foi medida por detecção da luminescência no SprectraMax i3. Os resultados da conversão são representados como os valores normalizados, que correspondem à média das unidades relativas de luminescência de cada tratamento dividido na gametocitemia de cada indivíduo.

A porcentagem da redução da formação de oocinetos foi calculada usando a fórmula $[(X_c - X_a)/X_c] \times 100$, onde X corresponde à média das leituras de RLU no grupo controle (c) e o grupo de prova (a) (Arévalo-Herrera et al., 2011).

5.10 Testes de infecção de *Anopheles darlingi* colonizado com *Plasmodium berghei* ANKA

5.10.1 Infecção de camundongos e mosquitos

Camundongos de 4 a 5 semanas de idade, foram infectados com 100 µl de sangue parasitado com *P. berghei* ANKA (selvagem). Entre os dias 4 ou 5 pós infecção, quando a gametocitemia atingiu um valor perto de 1 % (prévio diagnóstico parasitológico e contagem de gametócitos e parasitos totais), os camundongos anestesiados foram colocados para os mosquitos se alimentarem (Anestésico: cetamina = 90 mg/Kg e Xilazina = 9 mg/Kg (75 µl anestésico)).

Grupos de 100 mosquitos foram deixados em jejum 24 horas antes da infecção. Os mosquitos se alimentaram ad libitum sobre o camundongo previamente anestesiado. Os insetos não alimentados foram retirados da gaiola e o resto incubados em BOD a 21 °C, umidade relativa entre 80 - 90 % e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas escuridão.

5.10.2 Avaliação da presença de oocistos

7 dias pós infecção, entre 5 e 10 mosquitos foram sacrificados com etanol 98 % e depois postos em PBS. Os intestinos dissecados foram corados com mercurocromo 2% (0,66%) e observados no microscópio para a contagem dos oocistos por inseto.

5.10.3 Avaliação da presença de Esporozoítos

A dissecção das glândulas salivares foi feita no dia 20 após infecção (± 4). Os mosquitos dissecados e as glândulas esmagadas foram observadas no microscópio a 40X para procura dos esporozoítos. A quantidade de esporozoítos por glândula foi avaliada pelo método das cruzes: 1+ = 1–10 esporozoítos; 2+ = 11–100 esporozoítos; 3+ = 101–1000 esporozoítos; e 4+ = >1000 esporozoítos.

5.10.4 Infecção de camundongos com esporozoítos

Todos os insetos vivos até o dia 20 foram dissecados para a coleta de esporozoítos. Os insetos foram sacrificados em etanol 98 % e depois passados em PBS 1X. O pool de glândulas

foi posto em 50 µl PBS 1X frio e depois macerado. A amostra foi centrifugada, filtrada, e o flow through posto num tubo novo. A contagem dos esporozoítos foi feita em 25 quadros centrais da câmara de Neubauer (o número da contagem foi multiplicado por 10.000 para ter a quantidade de parasitos por ml). O pool de glândulas foi injetado via intravenosa nos camundongos previamente aquecidos com água morna. O seguimento da infecção foi realizado a partir de 3 dias pós infecção.

5.11 Colocalização da *PbMTRAP* marcada com GFP (Green Fluorescent Protein)

5.11.1 Estratégia parasitos *PbMTRAP*-GFP

Baseados na sequência genômica da *PbMTRAP* (PlasmoDB PBANKA_0512800 merozoite TRAP-like protein), desenhamos primers para amplificar diferentes regiões do gene alvo, do marcador de fluorescência e dos genes de seleção. Cada primer contém sequências para uma enzima de restrição, que permitiram clonar cada uma das sequências dentro do plasmídeo pBSSk+ (Tabela 2). A estratégia utilizada está resumida na figura 10, e consistiu em inserir o gene da GFP dentro da sequência codante da *PbMTRAP*, seguido do terminador da *PbTRAP* (*P. berghei* thrombospondin-related anonymous protein) do esporozoíto e do gene hDHFR (human dihydrofolate reductase) que confere resistência à pirimetamina; as regiões 5' e 3' da *PbMTRAP* foram utilizadas como regiões de homologia para a dupla recombinação (Figura 10).

Tabela 2. Primers desenhados para construção do plasmídeo que contém a sequência do gene da green fluorescent protein (GFP) inserido no gene da *PbMTRAP*.

Primer	Sequência 5' - 3'	Tamanho	Tm °C	%GC	Enzima
F-MTRAP_1.1	<u>GGTACC</u> ATGAAAACACATATTACTACTT	28	54	22.7	Kpn I
R-MTRAP_1.1	<u>CTCGAG</u> TTTCGTTATTATATTCAAAAGGG	28	56	27.3	Xho I
F-GFP	<u>CTCGAG</u> ATGGCTAACGCAAAAAGCTA	25	54	42.1	Xho I
R-GFP	<u>GTCGAC</u> TTTGTATAGTTCATCCATGC	26	54	35	Sal I
F-MTRAP_1.2	<u>GTCGACA</u> ACAATAGATATGATAGTTATAG	29	56	21.7	Sal I
R-MTRAP_1.2	<u>GATATC</u> TTACTCAGTGCCCCAAAATT	26	56	40	Eco32I
F-hDHFR	<u>GATATC</u> TTTAAATAAACATATATATCTAGAT	31	56	12	Eco32I
R-hDHFR	<u>CCCGGG</u> AAAATTGAAGGAAAAAACATCATT	29	56	21.7	SmaI
F-3'MTRAP	<u>CCCGGG</u> GTGTATACAATTTAAGAGAGG	27	56	33.3	SmaI
R-3'MTRAP	<u>GCGGCC</u> CGGCACGACTTTACATTCTG	27	56	47.4	Not I

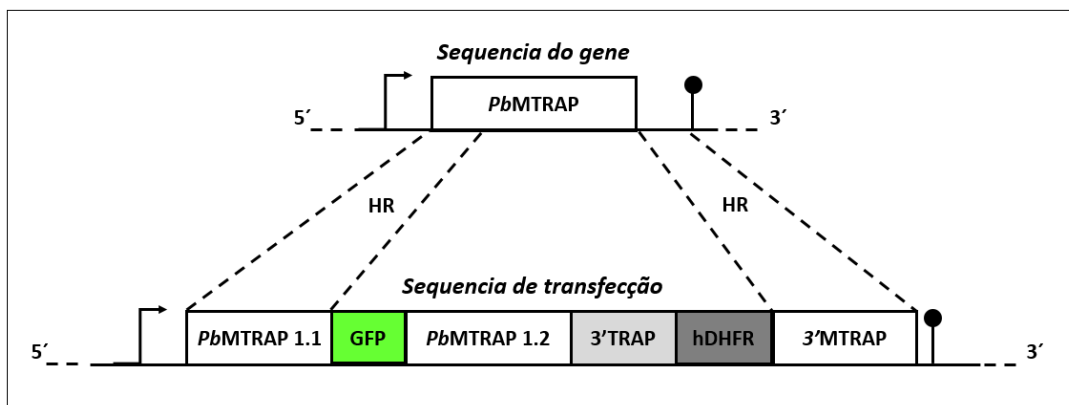


Figura 10. Estratégia de clonagem do parasito *P. berghei*-MTRAP-GFP, onde se representa a sequência wild type do gene e a sequência final de transfeção. O objetivo é inserir a sequência da GFP na sequência codante da MTRAP, assim como também o cassete de seleção com o gene de resistência a pirimetamina.

5.11.2 Amplificação de DNA por PCR (Polymerase Chain Reaction) e clonagem no vetor

A partir de DNA genômico de estágios sanguíneos de *P. berghei*, amplificamos as regiões MTRAP 1.1, MTRAP 1.2 e 3'MTRAP, usando 50 ng como template. A sequência da GFP e do 3'TRAP-hDHFR foram amplificadas a partir de 10 ng de plasmídeos com os insertos previamente ligados. As PCRs foram feitas em volumes de 25 µl e preparados como se resume na Tabela 3.

Tabela 3. Pré-Mix das reações de PCR e perfil térmico.

Master Mix para PCR		Perfil Térmico		
Componente	Concentração	Temperatura	Tempo	
Buffer 10X	3 mM Mg ²⁺	95 °C	5 minutos	1 X
dNTPs	200 µM de cada	95 °C	30 segundos	
Primer Forward	0.5 µM	54 °C	30 segundos	34
Primer Reverse	0.5 µM	68 °C	*	X
Takara	0.625 U	68 °C	10 minutos	
DNA	10-50 ng	12 °C	∞	

*O tempo de extensão dependeu do tamanho de cada inserto.

Depois de amplificados, todos os insertos foram ligados no vetor TOPO® TA® cloning (Invitrogen), e com ele se transformaram bactérias *E. coli* DH5- α . O DNA plasmidial das transformantes selecionadas com ampicilina foi extraído pelo kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) seguindo as especificações do fabricante.

Cada inserto foi extraído do TOPO-TA mediante digestão com enzimas de restrição, e depois clonado no plasmídeo final pBSSK+. Toda confirmação da presença dos inserto tanto no TOPO-TA como no pBSSK+ foi feita por análise de restrição utilizando as enzimas especificadas na Tabela 2.

5.11.3 Transfecção de Parasitos

Uma vez conseguido o plasmídeo completo, se procedeu a purificar suficiente quantidade de plasmídeo para a transfecção de merozoítos de *P. berghei* sincronizados em cultura, seguindo o protocolo proposto por Janse, Ramesar, & Waters, 2006.

Sincronização de merozoítos: 6 camundongos da linhagem BALB/c, foram infectados intraperitonealmente com parasitos criopreservados. 4 – 5 dias pós infecção, as hemácias do sangue coletado por punção cardíaca foram separadas da fração plasmática e leucocitária por centrifugação, ressuspendidas no meio de sincronização (Tabela 4), e incubadas em agitação a 37 °C com 5 % de CO₂ e 10 % de O₂ por 16 horas.

Purificação de esquizonte maduros por gradiente de Nycodenz: Após de verificar a sincronização mediante esfregaço das formas parasitarias na cultura, o sangue foi transferido em tubos cônicos de 50 ml para depois se acrescentar 10 ml de Nycodenz 15,2% no fundo do tubo, num fluxo lento e constante e evitando a formação de bolhas. Para a formação do gradiente, a mistura foi centrifugada a 340 g com aceleração máxima e sem break a temperatura ambiente por 25 minutos. A fração que corresponde aos esquizontes foi coletada num tubo novo e lavada para retirar restos de Nycodenz e concentrar os esquizontes.

Transfecção: O pellet de esquizontes foi misturado com 5 µl de plasmídeo concentrado (1 µg/µl) mais o tampão Nucleofector™ e depois homogeneizados; rapidamente os merozoítos foram eletroporados usando as cubetas Gene Pulser (BIO-RAD) no eletroporador Nucleofector™, programa U33. Os parasitos foram diluídos em PBS 1X e posteriormente injetados via intravenosa em dois camundongos da linhagem BALB/c.

Seleção de mutantes: 0,07 mg/ml de pirimetamina diluído na água do bebedouro foram ministrados aos camundongos a partir do dia 1 pós transfecção. Quando a parasitemia atingiu um valor $\geq 5\%$, os parasitos de cada camundongo (população parental) foram transferidos em dois camundongos naïves (população de transfer). O acompanhamento das parasitemias da população transfer foi feito e quando estas estiveram em $\geq 5\%$ os parasitos foram congelados. Alíquotas de parasitos das populações parental e transfer foram obtidas para a genotipagem.

Clonagem: Para a clonagem dos mutantes, parasitas da população transfer foram injetados via intraperitoneal num camundongo naïve e dois dias depois o sangue obtido por punção da veia maxilar foi diluído até conseguir uma concentração de 5 parasitos/ml. Depois, 100 µl da diluição (0,5 parasitos) foram injetados via intravenosa em 15 camundongos naïve. O sangue de camundongos positivos para *Plasmodium* no dia 10 foi congelado e uma alíquota foi utilizada para a extração de DNA genômico e posterior genotipagem.

5.12 Genotipagem de mutantes

A partir de uma alíquota de 200 µl de sangue de cada camundongo infectado depois da clonagem dos parasitos, foi extraído o DNA genômico de cada população de parasitos para a respectiva genotipagem. O DNA foi extraído mediante o DNeasy blood & tissue kit, seguindo as recomendações do fabricante.

Como se detalha na Figura 11 e na Tabela 4, primers foram desenhados para conferir a presença dos diferentes insertos que compõem a sequência de transfecção no genoma. Os primers dos extremos 5' e 3' (P1 e P4) alinham fora da região de homologia, portanto permitem saber se a sequência foi inserida no genoma. Com os primer P1 e P2, é possível conferir a presença da GFP; P3 e P4 permitem detectar a sequência no marcador de resistência a pirimetamina (hDHFR); com os primers P1 e P5 é possível verificar se a sequência da GFP foi inserido da metade da sequência da MTRAP e permitem comparar com a amplificação diferencial de sequências do tipo selvagem (Wild Type) (Figura 11).

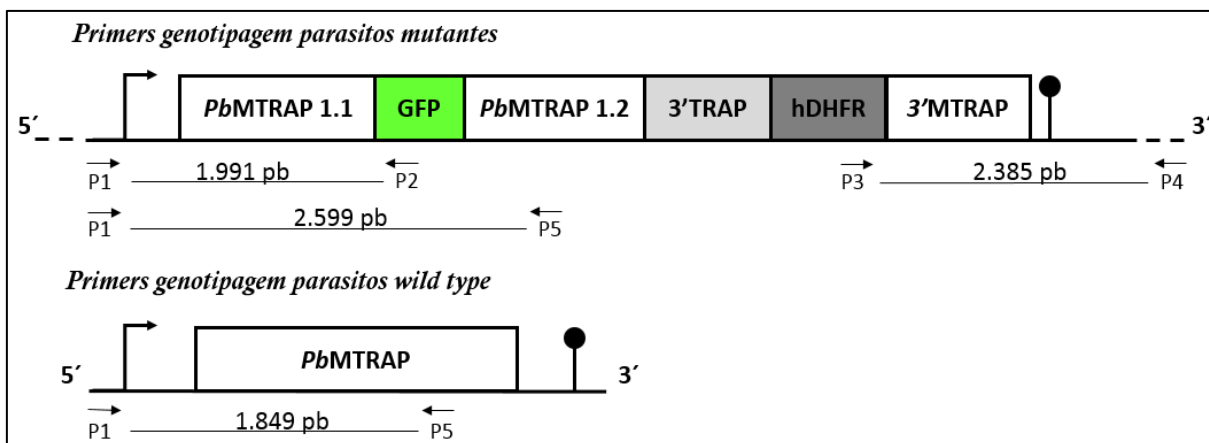


Figura 11. Primers para genotipagem dos parasitos *PbMTRAP*-GFP. 5 primers foram desenhados para confirmar a presença dos genes inseridos nos parasitos mutantes portadores em comparação com parasitos do tipo selvagem. Os Primers P1 e P2 não amplificam nenhuma região nos parasitos WT mas amplificam um fragmento de 1.991 pb nos mutantes. P3 e P4, não amplificam nenhuma região nos parasitos WT e nos mutantes amplificam um fragmento de 2.385 pb. P1 e P5, amplificam um fragmento de 1.849 pb nos parasitos selvagens e nos mutantes um de 2.599 pb.

Tabela 4. Sequência dos primers desenhados para confirmar a presença das sequências inseridas nos parasitos mutantes *PbMTRAP*-GFP em comparação com parasitos do tipo selvagem.

Fragmento	Primer	Sequência 5' - 3'	Comprimento	Tm °C	%GC
Pb_MTRAP_out HR F	F- P1	TTGTGTTGATTAATTAATGAAAA	24	56	16.7
Pb_inside GFP	R- P2	TCCTGTACATAACCTTCGG	19	56	47.4
Pb_3'TRAP + hDHFR	F- P3	GTAGACATGGTCTGGATAG	19	56	47.4
Pb_3'MTRAP out HR	R- P4	AATGACAATAAATTGACAAATGAA	23	56	21.7
Pb_MTRAP 1.2 WT	R- P5	ATCCCATACCACTAGCTAC	19	56	47.4

5.13 Microscopia de fluorescência

O sangue de camundongos infectados com os clones *PbMTRAP*-GFP, foi coletado para a preparação de lâminas dos estágios merozoítos, gametócitos e gameta. Os merozoítos/esquizontes e gametócitos foram obtidos a partir do sangue total mediante gradientes de Nycodenz 15,2% e 13,25%, respectivamente, enquanto os gametas foram ativados em meio de conversão (15 minutos) a partir duma alíquota de gametócitos.

O pellet de cada estágio de parasito foi ressuscitado em solução fixadora (PFA-4 %-Glutaraldehyde-0,0075 %) por uma hora, e após três lavagens com PBS 1X os parasitos incubados com DAPI (1:47000) por 10 minutos, lavados e ressuscitado em PBS 1X.

10 µl da solução de parasitos de cada estágio, foram colocadas em lâminas, depois tampadas com a lamínula e selada com esmalte para posteriormente ser observadas no microscópio de fluorescência.

5.14 Análise estatística

Títulos de anticorpos e taxas de conversão de oocinetos entre grupos, foram analisadas mediante o teste estatístico *t*-Student e ANOVA, usando o pacote estatístico GraphPad Prism, versão 5.01. Valores de *P* menores que 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas.

6 RESULTADOS

6.1 Expressão da *P. berghei*-MTRAP

Inicialmente, para produzir uma proteína recombinante solúvel em bactérias, a região aminoacídica 26–561 (sequência com otimização de códons para expressão em *E. coli*, GenScript), entre o peptídeo sinal e o domínio transmembrana da *PbmMTRAP* que inclui 16 determinantes antigênicos, foi clonada no vetor de expressão pET28a. O produto final purificado, foi uma proteína de um peso molecular previsto de 70 kDa, com um padrão de migração eletroforética entre 70 e 100 kDa (Figura 12A). A correta purificação do recombinante foi confirmada por Western Blot, utilizando anticorpos anti-histidina que reconheceram a cauda hexa-histidina do recombinante, apresentando um tamanho de entre 70 e 100 kDa (Figura 12B).

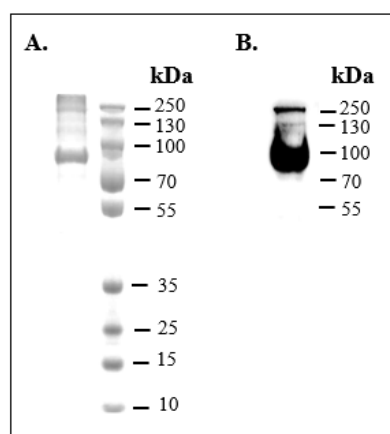


Figura 12. Confirmação da expressão da *PbmMTRAP* recombinante. **A.** Análise SDS-PAGE da *PbmMTRAP* recombinante. 4 μ g da *PbmMTRAP* recombinante purificada, migrada sob condições redutoras com B-mercaptoetanol em gel SDS-PAGE 10%. **B.** Western Blot de reconhecimento da cauda de hexa histidina da *PbmMTRAP* recombinante. 2 μ g da proteína recombinante foram corridos em gel SDS-PAGE 10% e condições redutoras com B-mercaptoetanol e depois transferidos na membrana de nitrocelulose. Anticorpos anti-histina e goat anti-Mouse-HRP foram utilizados na detecção.

6.2 Teste de imunogenicidade de camundongos

Para testar a imunogenicidade da *PbmMTRAP*, camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados com a proteína recombinante purificada em combinação com o adjuvante incompleto de Freund (IFA) para produzir anticorpos policlonais. Os níveis de IgG anti-*PbmMTRAP* foram medidos por ELISA depois da terceira imunização. Os resultados mostraram, que os títulos de anticorpos no grupo imunizado apresentam um aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 13), indicando que a imunização

com o *rPbMTRAP* induziu com sucesso a produção de anticorpos específicos em camundongos.

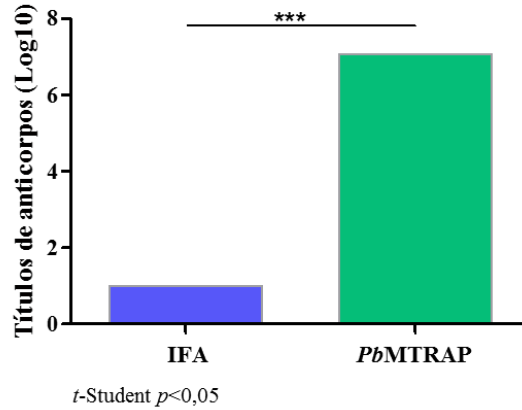


Figura 13. Títulos de anticorpos gerados contra a *rPbMTRAP* e medidos mediante ELISA. Pool de soros de cada tratamento (8 camundongos imunizados com a *rPbMTRAP* e 8 imunizados só com o adjuvante IFA) depois de três imunizações. *** $p < 0,05$ (*t*-Student)

6.3 Anticorpos anti-*PbMTRAP* reconhecem a proteína desnaturada

A especificidade do pool de antissoro anti-*PbMTRAP* foi determinada mediante ensaios de Western Blot. Nós observamos, que os anticorpos dos soros de camundongos imunizados com o *rPbMTRAP* reconheceram uma banda de aproximadamente 85 kDa e dois fragmentos processados de 55 e 35 kDa no extrato total de parasitos (Figura 14).

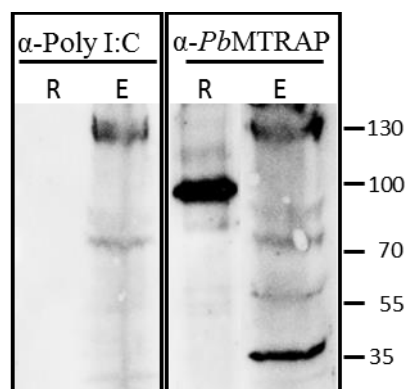


Figura 14. Reconhecimento da proteína nativa pelos anti-*PbMTRAP* mediante análise de Western Blot. Lisado de parasitos totais (wild type) em buffer RIPA (20 μ g de proteína) e a *rPbMTRAP* (2ng), migrado em SDS-PAGE 7,5% sob condições redutoras com β -mercaptoetanol e depois transferidos na membrana de nitrocelulose. Como anticorpo primário foram usados anti-soro do grupo controle e experimental (anti- IFA/ α -IFA e anti-*PbMTRAP*/ α -*PbMTRAP* respectivamente) e goat anti-Mouse-HRP foi utilizado como anticorpos secundário. R: Proteína recombinante; E: Extrato total de parasitos.

6.4 Imunofluorescência de gametócitos de *P. berghei*

A localização da *PbMTRAP* e seu reconhecimento por parte dos anticorpos anti-*PbMTRAP* foi avaliada por Imunofluorescência. Neste ensaio, foi possível observar a fluorescência na superfície de gametócitos coletados por gradiente de Nycodenz nas amostras tratadas com os α -*PbMTRAP* (Figura 15).

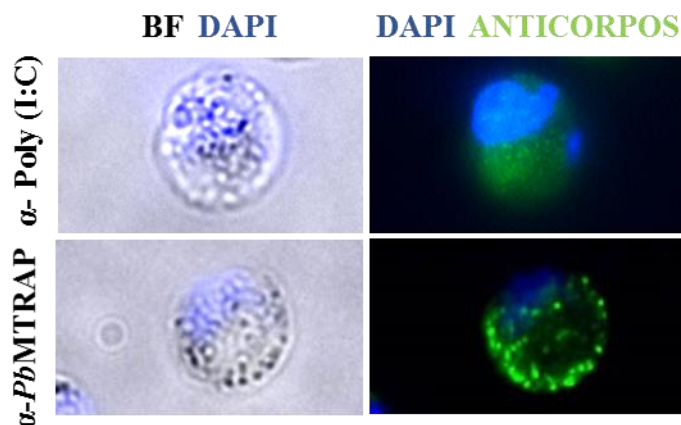


Figura 15. Ensaio de Imunofluorescência de gametócitos de *P. berghei* ANKA WT com anticorpos anti-*PbMTRAP* e anti-Poly (1:1) (α -IFA e α -*PbMTRAP*). Gametócitos obtidos por gradiente de nycodenz 13,25%. Anticorpo secundário anti-Mouse Alexa® flúor 488.

6.4 Ensaios de conversão com anticorpos purificados

Para testar se os anticorpos purificados têm um efeito inibidor na formação de oocinetos, testamos concentrações de anticorpos desde 3,12 μ g/ml a 500 μ g/ml, diluídos no meio de conversão (meio de oocinetos). O desenho de nossos experimentos permitiu fazer as medições da conversão de gametócitos a oocinetos por meio de bioluminescência, já que os parasitos utilizados têm um gene repórter para expressão de luciferase especificamente quando há formação de oocineto (parasitos Ookluc). As unidades relativas de luminescência foram detectadas em fluorímetro depois de misturar o sangue parasitado com o meio indutor de oocinetos e incubação por 24 horas a 21 °C (\pm 1). As concentrações de anticorpos testadas não inibiram a formação de oocinetos (Figura 16). Diante destes resultados, se decidiu fazer algumas modificações ao protocolo e testar nossa hipótese com anticorpos circulantes (não purificados).

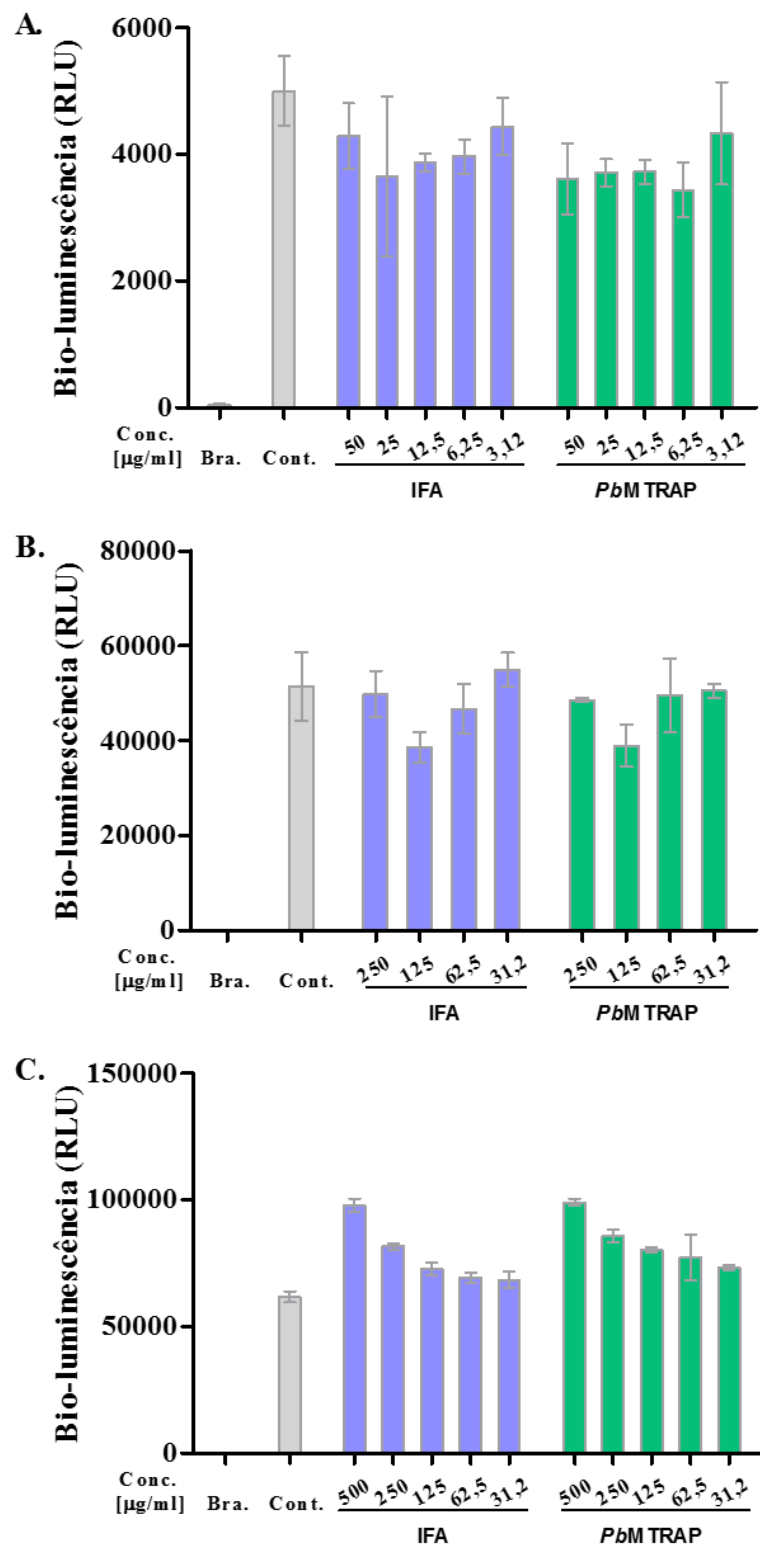


Figura 16. Ensaios de conversão com anticorpos purificados por proteína G-sepharose. Testes de diferentes concentrações de anticorpos dos grupos experimental (*PbMTRAP*) e controle (IFA) diluídos no meio de oocinetos. Os controles correspondem a: Branco (Bra.) 20µl de PBS + 20µl de substrato; Controle (Cont.), 20µl de meio de oocinetos + 20µl de substrato; 4µl de sangue parasitado por poço foi acrescentado a cada tratamento. **A.** Ensaio 1. **B.** Ensaio 2, **C.** Ensaio 3. Os resultados correspondem à média das unidades relativas de luminescência (Relative luminescence unit: RLU) por triplicata. A barra de erro representa o desvio padrão (Standard Deviation: SD).

6.5 Ensaio de conversão com anticorpos não purificados

6.5.1 Experimento 1. Imunização com a proteína *PbMTRAP*, imunogenicidade, desafio e ensaio de conversão.

Para este teste, camundongos foram imunizados utilizando o esquema mostrado na figura 8B. Depois das imunizações com a *rPbMTRAP* em combinação com o adjuvante Poly (I:C), procedeu-se com o teste de imunogenicidade. Os títulos de anticorpos foram aumentados no grupo experimental de acordo com a quantidade de doses recebidas da *rPbMTRAP* (Figura 17A).

Duas semanas depois da terceira imunização, os camundongos dos três grupos (controle PBS, controle Poly I:C e *PbMTRAP*) foram desafiados com 5.000 formas assexuadas do parasito *Ookluc*, e a parasitemia foi acompanhada por microscopia. Quando a gametocitemia chegou perto de 0,5 %, um ensaio de conversão foi feito para testar a atividade bloqueadora da formação de oocinetos dos anticorpos circulantes em cada camundongo. Depois de 24 horas de incubação a 21 °C (± 1) as medições de luminescência foram feitas. A formação de oocinetos teve uma redução média de 83 % no grupo imunizado com a *rPbMTRAP* em comparação com o grupo controle Poly (I:C) (Figura 17B).

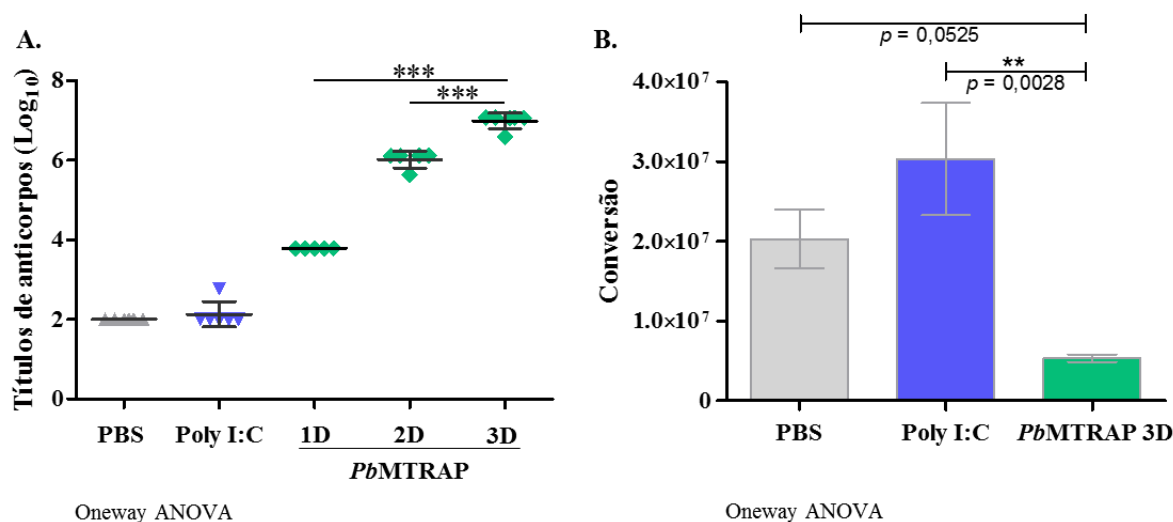


Figura 17. Imunização com a *PbMTRAP* induz anticorpos capazes de impedir a formação de oocinetos, experimento 1. (Camundongos: PBS n=6, Poly (I:C) n=6, *PbMTRAP* n=5-6) **A:** Títulos de anticorpos dos grupos controle e imunizados com a *rPbMTRAP*, medidos por ELISA; 1D: uma dose, 2D: duas doses, 3D: três doses. Oneway ANOVA *** $p < 0,05$ (Tukey's). **B:** Ensaio de conversão com anticorpos circulantes (não purificados). Sangue de camundongos imunizados e depois desafiados foi diluído em meio de oocinetos. Leitura de luminescência 24 horas depois de incubação. Os resultados correspondem à conversão de oocinetos (Média das unidades relativas de luminescência (Relative luminescence unit: RLU) /Gametocitemia). A barra de erro representa o desvio padrão (Standard Deviation: SD). Oneway ANOVA ** $p < 0,05$ (Tukey's).

Por outro lado, não houve diferença na multiplicação assexuada e sexuada dos parasitos em animais imunizados com a *PbMTRAP* em comparação com o controle (Figura 18A e B).

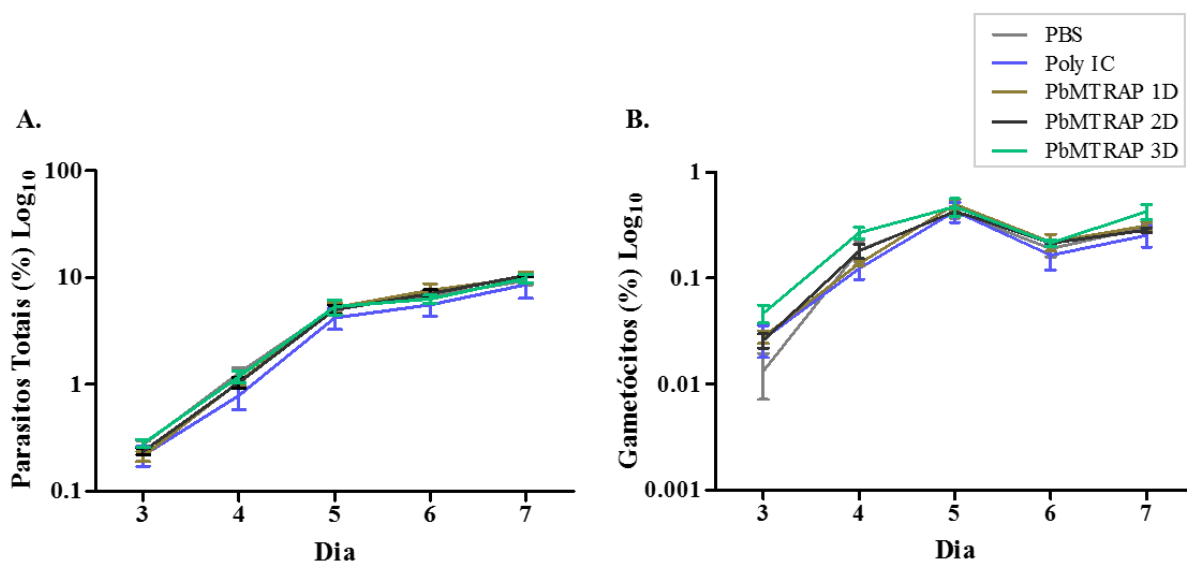


Figura 18. Parasitemia (A) e gametocitemia (B) de *P. berghei* OoKluc em camundongos imunizados com a *rPbMTRAP*, experimento 1. Cálculo de parasitos observados em 5.000 hemácias. Os resultados correspondem à média das contagens por camundongo. A barra de erro representa o desvio padrão (Standard Deviation: SD).

6.5.2 Experimento 2. Imunização com a proteína *PbMTRAP*, imunogenicidade, desafio e ensaio de conversão.

No segundo experimento, fizemos imunizações com três doses. Nessa ocasião, camundongos foram imunizados com a *rPbMTRAP* (10 µg/dose) em combinação com o adjuvante Poly (I:C), e o grupo controle foi imunizado com o adjuvante diluído em PBS. Depois de cumprir com o esquema de imunização, foram detectados altos títulos de anticorpos específicos nos soros dos camundongos imunizados com a *rPbMTRAP* (6 animais) (Figura 19A). Os camundongos foram, então, desafiados com o parasito *P. berghei* OoKluc e o ensaio de conversão foi realizado quando as gametocitemias chegaram perto de 0,5 %. Uma redução de 49% da formação de oocinetos, foi observada no grupo *PbMTRAP* em comparação com o grupo controle (Figura 19B). Novamente, não foram encontradas diferenças no comportamento das parasitemias e gametocitemias entre os grupos (Figura 20). Nossos resultados mostram que a imunização com a *rPbMTRAP* não tem um efeito sobre as populações sanguíneas do parasito, mas aparentemente tem um efeito redutor na formação de oocinetos.

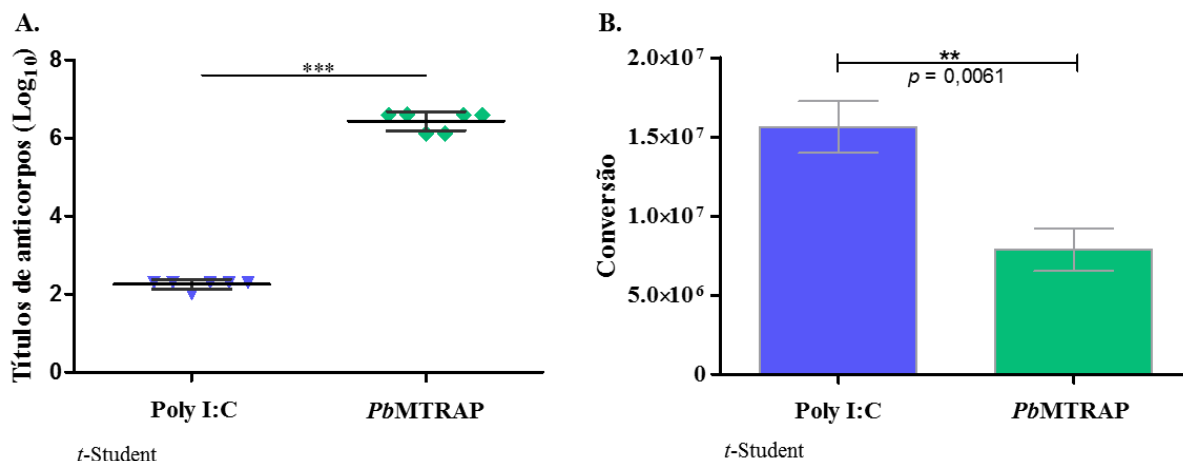


Figura 19. Imunização com a rPbMTRAP induz anticorpos capazes de impedir a formação de oocinetos, experimento 2. (Camundongos: Poly (I:C) n=6 e PbMTRAP n=6) **A:** Títulos de anticorpos dos grupos controle e imunizados com o recombinante PbMTRAP medidos por ELISA. *** $p < 0,05$ (t-Student). **B:** Ensaio de conversão com anticorpos circulantes (não purificados). Sangue de camundongos imunizados e depois desafiados foi diluído em meio de oocinetos. Leitura de luminescência 24 horas depois de incubação. Os resultados correspondem à conversão de oocinetos (Média das unidades relativas de luminescência (Relative luminescence unit: RLU) /Gametocitemia). A barra de erro representa o desvio padrão (Standard Deviation: SD). ** $p < 0,05$ (t-Student).

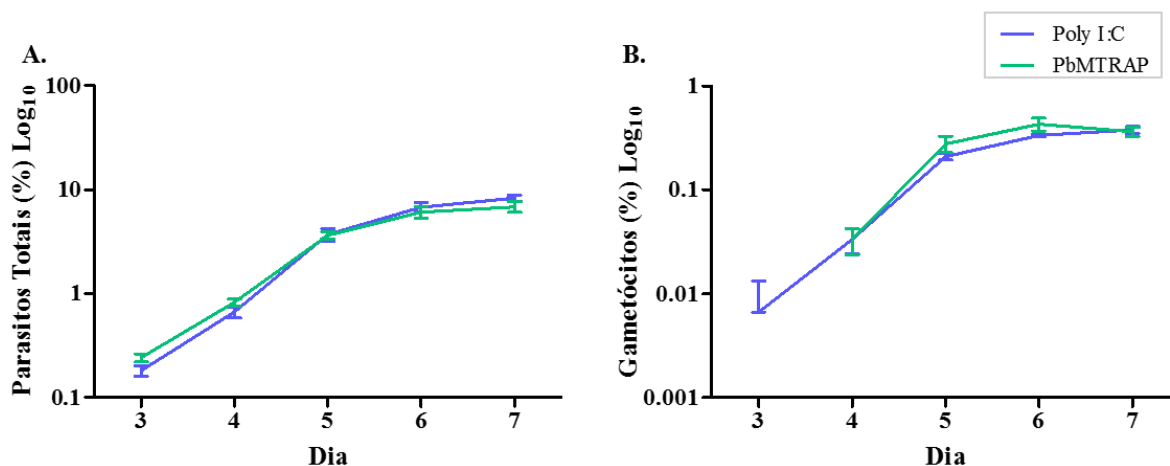


Figura 20. Parasitemia (A) e gametocitemia (B) de *P. berghei* Ooclu em camundongos imunizados com a rPbMTRAP, experimento 2. Cálculo de parasitos observados em 5.000 hemácias. Os resultados correspondem à média das contagens por camundongo. A barra de erro representa o desvio padrão (Standard Deviation: SD).

6.5.3 Experimento 3. Títulos das subclasses de IgG pré e pós desafio

Baseados na hipótese de que as diferenças observadas nos ensaios de conversão entre anticorpos purificados e não purificados aconteceram devido ao aumento dos títulos de anticorpos anti-PbMTRAP durante a infecção, ou que o padrão de subclasses da resposta de anticorpos seja alterado devido ao ambiente inflamatório, desenhamos um experimento para coletar os anticorpos dos animais imunizados antes e depois do desafio. Para isso, 8

camundongos foram imunizados três vezes com intervalos de três semanas entre cada imunização. No dia 50 foi feito o teste de imunogenicidade para IgG totais e subclasses de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b) e no dia 58, 4 camundongos foram sacrificados para a coleta de soro e posterior purificação de anticorpos. Os 4 camundongos restantes foram desafiados com 5.000 parasitos *Ookluc* e um ensaio de conversão foi feito quando a gametocitemia atingiu um valor perto de 0,5%. Posteriormente, os soros destes camundongos também foram coletados para analisar os títulos de IgG totais e das subclasses de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b) e respectiva purificação de anticorpos pós desafio. Um grupo controle só imunizado com Poly (I:C) foi mantido nas mesmas condições (Figura 21).

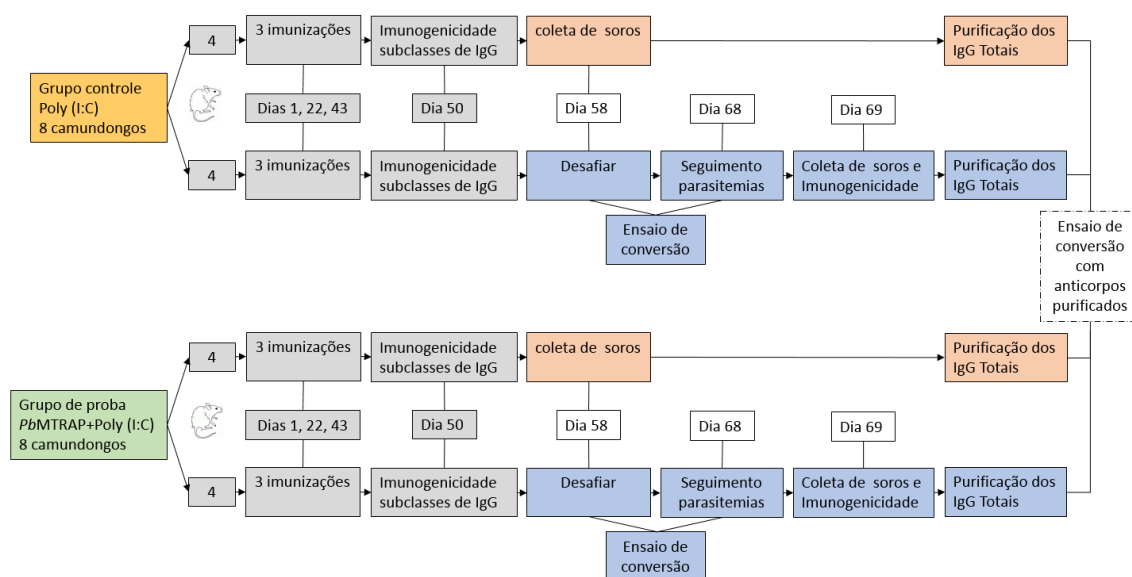


Figura 21. Desenho do experimento para avaliar os títulos de subclasses de IgG de camundongos imunizados com *PbMTRAP* desafiados e não desafiados.

Quanto aos títulos de anticorpos do grupo controle, observamos que os títulos de IgG totais se mostram ligeiramente aumentados pós desafio, passando de 2 [Log10] a 3.374 [Log10]; as subclasses de IgG não apresentaram alterações depois do desafio, mantidos num título médio de 2 [Log10] (Figura 22A e B). Do mesmo modo, no grupo imunizado com a *rPbMTRAP*, os títulos de IgG totais, IgG1 e IgG2a tiveram valores similares antes e depois do desafio (Figura 21 A, B e C). Neste grupo, só os IgG2b tiveram uma queda de 6,1 [Log10] até 3,25 [Log10] após desafio, apresentando diferenças estatisticamente significativas (Figura 22C).

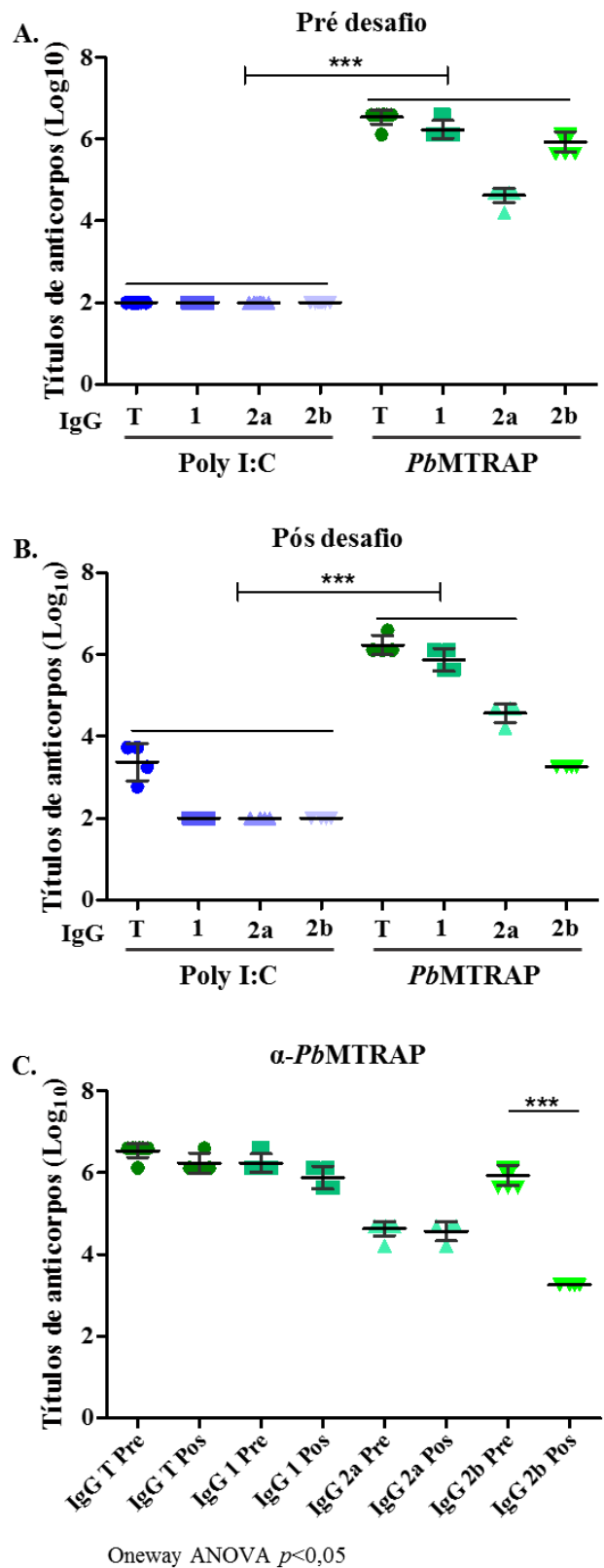


Figura 22. Títulos de subclasses de IgG de soro de camundongos imunizados com a rPbMTRAP medidos por ELISA. **A.** Títulos de subclasses de IgG pré desafio. **B.** Títulos de subclasse de IgG pós desafio. **C.** Comparação dos títulos de subclasses de IgG anti-PbMTRAP (α -PbMTRAP) pré e pós desafio. Os dados mostram os títulos de anticorpos representados em logaritmo de 10. Oneway ANOVA *** $p < 0,05$ (Tukey's).

Neste experimento, o ensaio de conversão feito com os camundongos desafiados não mostrou um efeito redutor na formação de oocinetos *in vitro*, já que o grupo imunizado com Poly (I:C) e o grupo imunizado com a *rPbMTRAP*, apresentaram leituras na conversão com valores de $5,68 \times 10^6$ e $3,36 \times 10^6$ 0respectivamente (Figura 23), mesmo tendo gametocitemias parecidas no dia do ensaio (dia 7, Poly(I:C): 0,39 %; *PbMTRAP*: 0,43 %) (Figura 24).

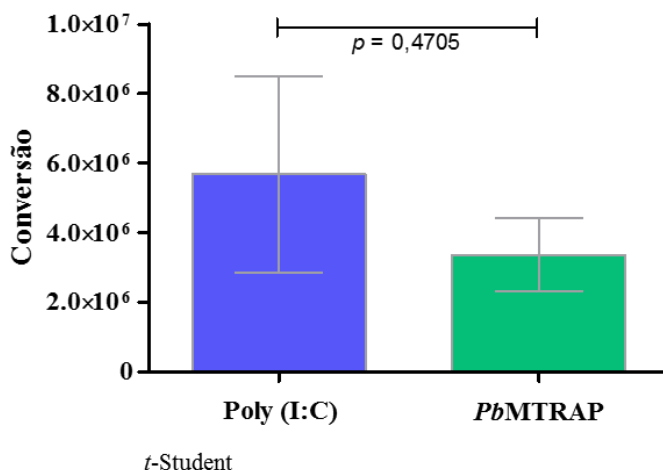


Figura 23. Ensaio de conversão com anticorpos circulantes (não purificados), experimento 3. Sangue de camundongos imunizados e depois desafiados foi diluído em meio de oocinetos. Leitura de luminescência 24 horas depois de incubação. Os resultados correspondem à conversão de oocinetos (Média das unidades relativas de luminescência (Relative luminescence unit: RLU) /Gametocitemia). A barra de erro representa o desvio padrão (Standard Deviation: SD)(*t*-Student).

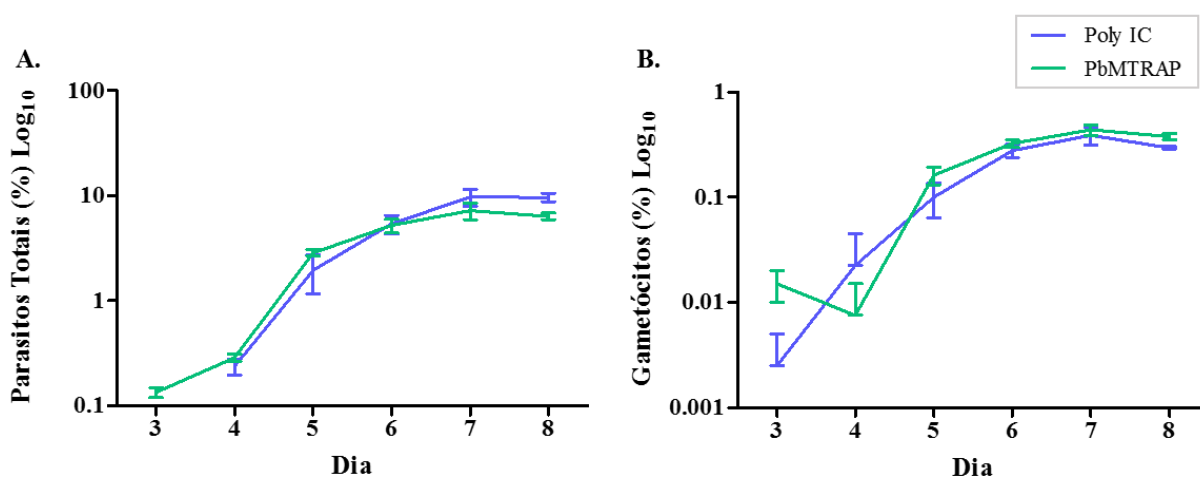


Figura 24. Parasitemia (A) e gametocitemia (B) de *P. berghei* Oocluc em camundongos imunizados com a *rPbMTRAP*, experimento 3. Cálculo de parasitos observados em 5.000 hemácias. Os resultados correspondem à média das contagens por camundongo. A barra de erro representa o desvio padrão (Standard Deviation: SD).

Com relação ao teste de anticorpos purificados por proteína G-sepharose pré e pós desafio proposto na figura 20, nós testamos uma concentração máxima de 500µg/ml de

anticorpos para cada tipo de anticorpo. Os resultados mostram que os anticorpos pré desafio tanto do grupo imunizados com Poly (I:C) e com a *rPbMTRAP*, não apresentam uma redução da formação de oocinetos quando comparados com o grupo controle de Meio/PBS, o controle que contém a mesma quantidade de PBS que os grupos de prova (Figura 25). Por outro lado, algo que chama a atenção, foi que os anticorpos pós desafio dos dois grupos testados (anti- Poly (I:C) e anti-*PbMTRAP*) bloqueiam totalmente a conversão (Figura 25), o que não coincide com o resultados do ensaio de conversão com anticorpos não purificados dos animais imunizados e depois desafiados resumido na figura 22, no qual não existe um bloqueio na formação de oocinetos por parte de nenhum tipo de anticorpo de prova, provavelmente devido às concentrações baixas de anticorpos inibitórios induzidos durante a infecção.

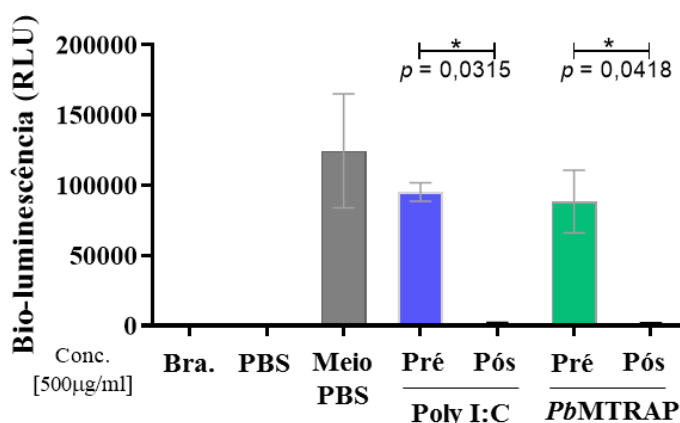


Figura 25. Ensaio de conversão com anticorpos purificados por proteína G-sepharose, pré e pós desafio, experimento 3. Testes de 500µg/ml de anticorpos dos grupos experimental (*PbMTRAP*) e controle (Poly I:C) diluídos no meio de oocineto. Os controles correspondem a: Branco (Bra.) 20µl de substrato; PBS, 20µl de PBS + 20µl de substrato; Meio/PBS, 6,27µl de meio de oocinetos + 13,73µl de PBS + 20µl de substrato 2µl de sangue parasitado por poço foi acrescentado a cada tratamento. Os resultados correspondem à média das unidades relativas de luminescência (Relative luminescence unit: RLU) de dois ensaios. A barra de erro representa o desvio padrão (Standard Deviation: SD). Oneway ANOVA* $p < 0,05$ (Tukey's).

Como o último resultado do ensaio de conversão não reproduziu os dois primeiros, decidimos fazer mais dois experimentos testando 3 e 4 imunizações tanto em camundongos C57BL/6 como em BALB/c.

6.5.4 Experimento 4. Camundongos C57BL/6

8 camundongos da linhagem C57BL/6 foram imunizados 3 vezes com a *rPbMTRAP*, seguindo o esquema utilizado nos experimentos anteriores. Os soros coletados uma semana

depois da última imunização mostraram altos títulos de IgG no grupo *PbmMTRAP* com um valor médio de 6,5[Log10], em comparação com os grupos Naïve e Poly (I:C) (2,3 ([Log10]). Diferenças estatisticamente significativas com os grupos controles e o grupo imunizados com o recombinante foram observadas (Figura 26A). Quanto aos ensaios de conversão, observamos que a quantidade de oocinetos foi semelhante no grupo imunizado com a *rPbmMTRAP* em relação aos grupos controles (Figura 26B). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos.

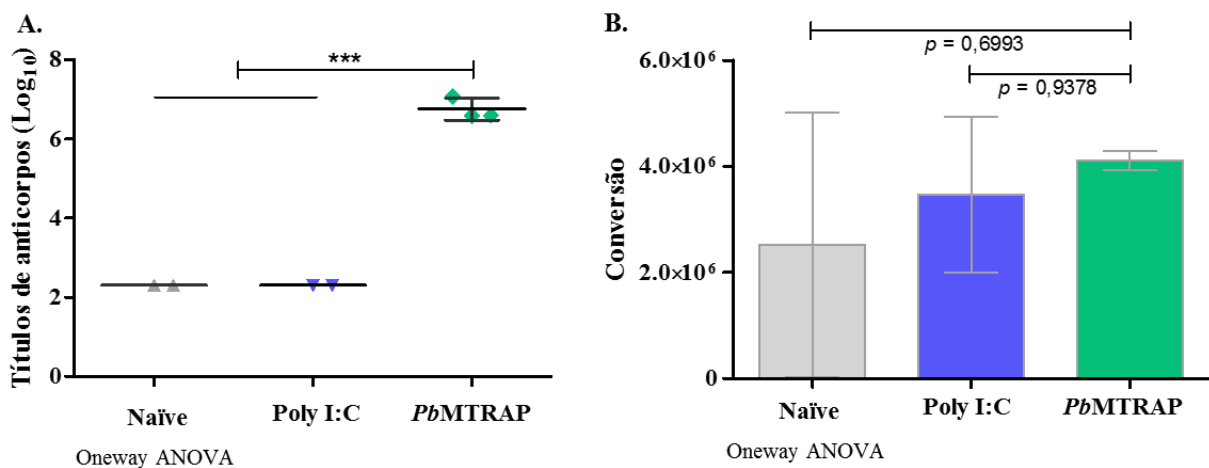


Figura 26. Teste de imunogenicidade e ensaio de conversão experimento 4, camundongos C57BL/6. **A.** Títulos de IgG totais de soro individual de camundongos 3 vezes imunizados (Camundongos: Naïve n=2, Poly (I:C) n=2 e *PbmMTRAP* n=3) medidos por ELISA. Oneway ANOVA*** p<0,05 (Tukey's). **B.** Ensaio de conversão com anticorpos circulantes (não purificados). Sangue de camundongos imunizados e depois desafiados foi diluído em meio de oocinetos. Leitura de luminescência 24 horas depois de incubação. Os resultados correspondem à conversão de oocinetos (Média das unidades relativas de luminescência (Relative luminescence unit: RLU) /Gametocitemia). A barra de erro representa o desvio padrão (Standard Deviation: SD). Oneway ANOVA (Tukey's).

Ao longo do experimento, as parasitemias foram variáveis mas crescentes no tempo (Figura 27A) e as gametocitemias de cada grupo no dia do ensaio de conversão (Dia 6) foram: Naïve, 0,34 %; Poly (I:C), 0,23 % e *PbmMTRAP*, 0,26 % nos camundongos (Figura 27B). Isso sugere que os resultados dos ensaios de conversão não são consequência de diferenças nas quantidades de gametócitos nos camundongos dos diferentes tratamentos.

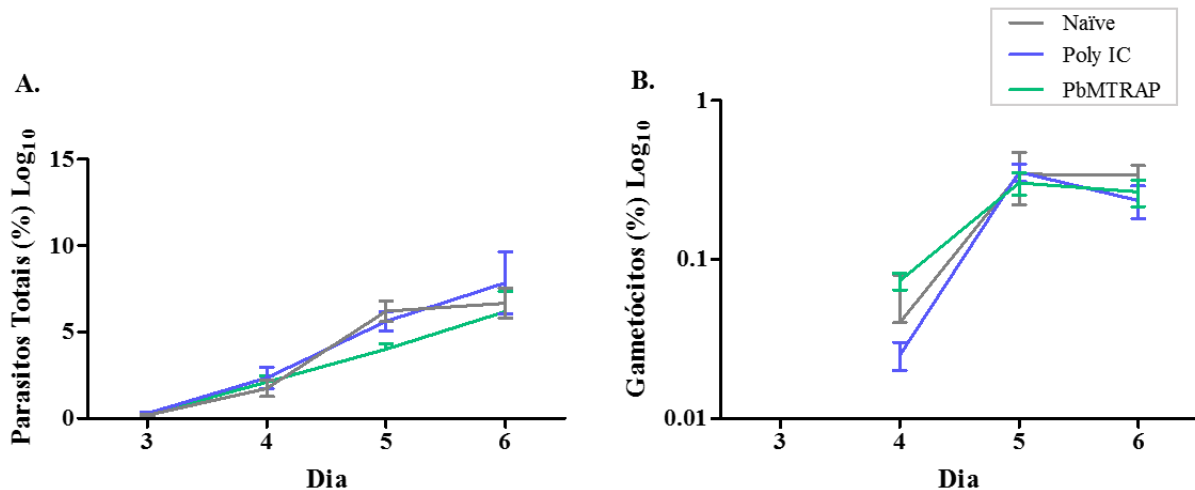


Figura 27. Parasitemia (A) e gametocitemia (B) de *P. berghei* OoKluc em camundongos 3 vezes imunizados com a *rPbMTRAP*, experimento 4. Cálculo de parasitos observados em 5.000 hemácias. Os resultados correspondem à média das contagens por camundongo. A barra de erro representa o desvio padrão (Standard Deviation: SD).

6.5.5 Experimento 5. Camundongos BALB/c (3 e 4 imunizações)

16 camundongos da linhagem BALB/c receberam 3 e 4 doses da *rPbMTRAP*, seguindo o esquema utilizado nos experimentos anteriores. Os soros coletados uma semana depois da última imunização mostraram altos títulos de IgG com valores de 6,5 [Log₁₀] nos camundongos que receberam 3 e 4 doses (Figura 28A e B). Não observamos nenhum efeito da quarta imunização com a *rPbMTRAP* sobre os títulos de anticorpos em comparação com o grupo de camundongos que recebeu 3 imunizações.

As parasitemias dos diferentes tratamentos foram variáveis mas crescentes no tempo (Figura 29A e B), e para o dia do ensaio de conversão as gametocitemia dos camundongos que receberam 3 imunizações (dias 5), foram relativamente iguais (Naïve: 0,240 %; Poly (I:C): 0,207 %; *PbMTRAP*: 0,19 %), mas para o grupo de 4 imunizações (dia 6), estas apresentaram certa variação (Naïve: 0,22 %; Poly (I:C): 0,31 %; *PbMTRAP*:0,51 %) (Figura 29C e D). Por outro lado, as leituras das quantidades oocinetos no grupo de camundongos que recebeu 3 doses do recombinante, mesmo que mais baixas ($4,59 \times 10^6$) em relação ao controle Poly (I:C) ($1,06 \times 10^7$), não foram muito distantes daqueles formados no grupo controle Naïve ($6,55 \times 10^6$) (Figura 28C). Este mesmo problema com os controles foi observado no grupo de camundongos que recebeu 4 imunizações, neste caso o grupo naïve apresentou uma leitura média de conversão $1,12 \times 10^7$, e os grupos Poly (I:C) e *PbMTRAP* $5,16 \times 10^6$ e $1,99 \times 10^6$ respectivamente (Figura 28D).

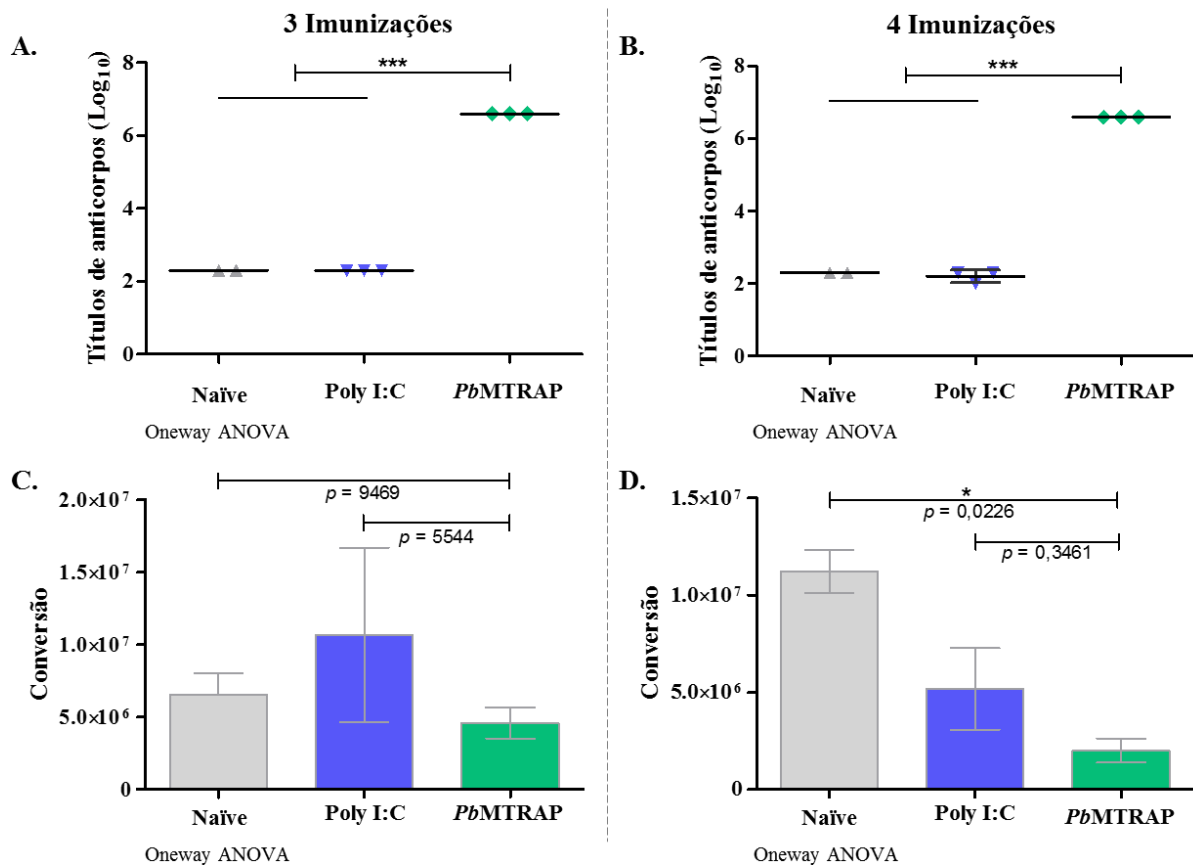


Figura 28. Camundongos BALB/c imunizados 3 e 4 vezes com a rPbMTRAP, experimento 5. **A.** Títulos de IgG totais de soro individual de camundongos 3 vezes imunizados (Naive n=2, Poly (I:C) n=3 e PbMTRAP n=3), medidos por ELISA. **B.** Títulos de IgG totais de soro individual de camundongos (Naive n=2, Poly (I:C) n=3 e PbMTRAP n=3) depois de 4 imunizações, medidos por ELISA. Oneway ANOVA *** $p < 0,05$ (Tukey's). Ensaio de conversão com anticorpos circulantes (não purificados). Sangue de camundongos imunizados e depois desafiados foi diluído em meio de oocinetos. **C.** Grupo de camundongos que recebeu 3 doses da rPbMTRAP. **D.** Grupo de camundongos que recebeu 4 doses do rPbMTRAP. Leitura de luminescência 24 horas depois de incubação. Os resultados correspondem à conversão de oocinetos (Média das unidades relativas de luminescência (Relative luminescence unit: RLU) /Gametocitemia). A barra de erro representa o desvio padrão (Standard Deviation: SD) Oneway ANOVA * $p < 0,05$ (Tukey's).

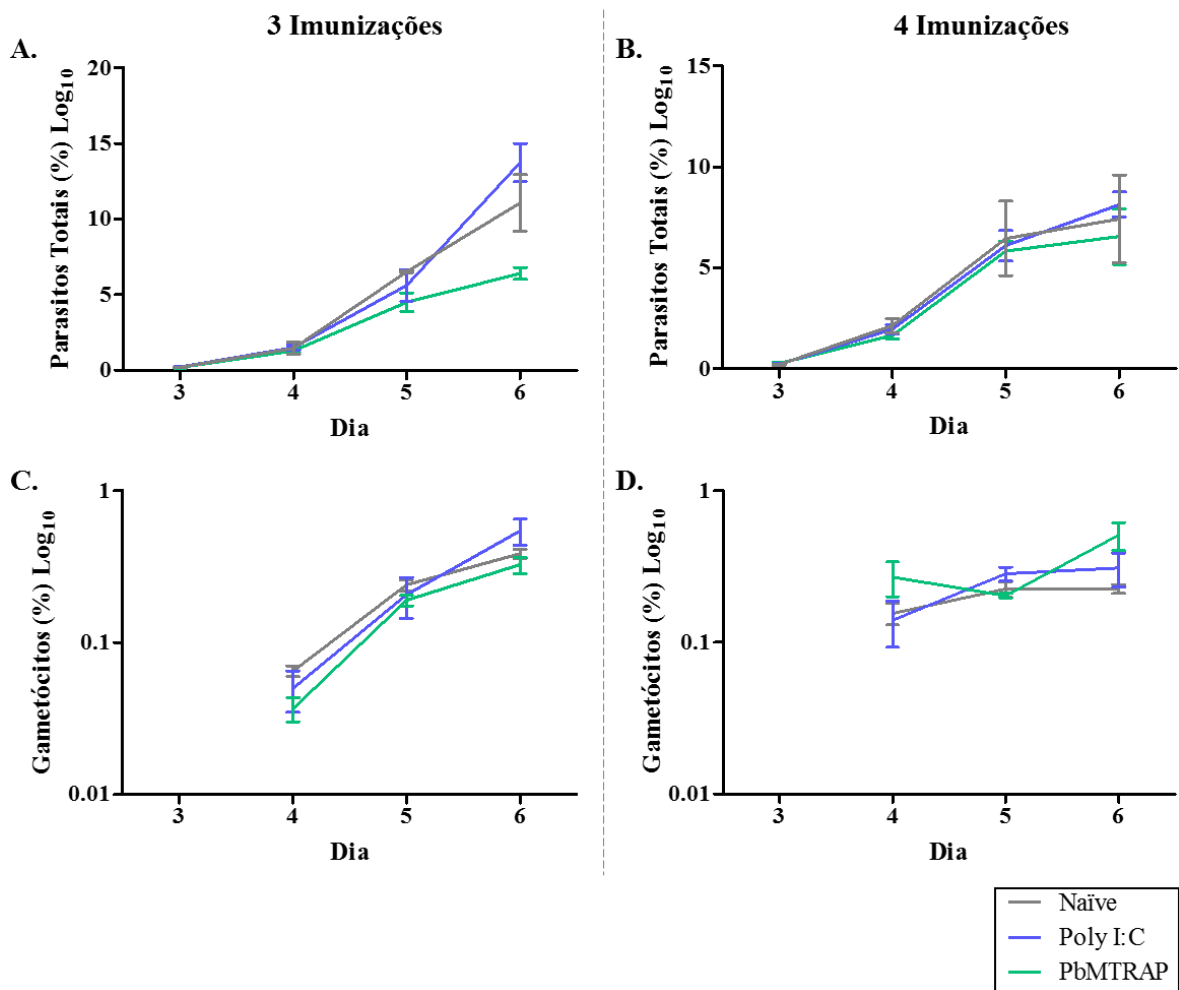


Figura 29. Acompanhamento das parasitemias do experimento 5. Parasitemia (A) e gametocitemia (C) de *P. berghei* Ookluc em camundongos 3 vezes imunizados com a *rPbMTRAP*. Parasitemia (B) e gametocitemia (D) de *P. berghei* Ookluc em camundongos 4 vezes imunizados com a *rPbMTRAP*. Cálculo de parasitos observados em 5.000 hemácias. Os resultados correspondem à média das contagens por camundongo. A barra de erro representa o desvio padrão (Standard Deviation: SD).

Fazendo um resumo dos diferentes experimentos feitos com anticorpos não purificados e utilizando dados normalizados com as gametocitemias de cada camundongo, observamos:

Experimento 1. Redução média da formação de oocinetos de 83 % nos grupos tratados com o recombinante (Figura 30A).

Experimento 2. Redução da formação de oocinetos de 47 % no grupo imunizado com o recombinante (Figura 30B).

Experimento 3. Grupo imunizado com a *PbMTRAP* teve uma taxa de conversão menor que o grupo controle, sem diferença estatisticamente significativa (Figura 30C).

Experimento 4. Não se observa redução (Figura 30D).

Experimento 5. Não se observa redução concreta já que os controles apresentaram variações (Figura 30E e F). No grupo que recebeu 4 doses da proteína foram observadas diferenças

estatisticamente significativas com grupo Naïve.

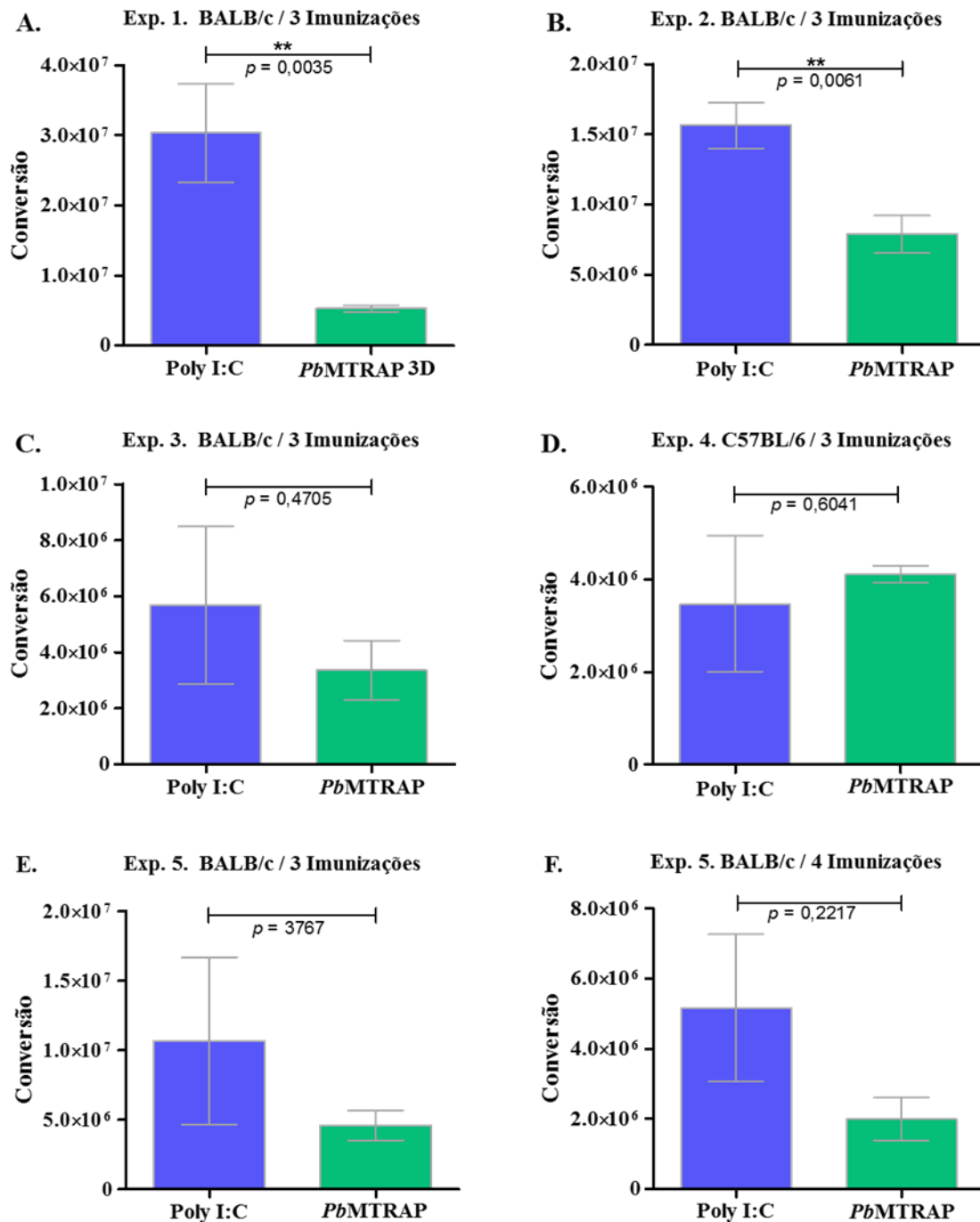


Figura 30. Resumo de ensaios de conversão com anticorpos não purificados. **A.** Experimento 1. Camundongos BALB/c que receberam 3 doses da *rPbMTRAP*. **B.** Experimento 2. Camundongos BALB/c que receberam 3 doses da *rPbMTRAP*. **C.** Experimento 3. Camundongos BALB/c que receberam 3 doses da *rPbMTRAP*. **D.** Experimento 4. Camundongos C57BL/6 que receberam 3 doses da *rPbMTRAP*. **E** e **F.** Experimento 5. Camundongos BALB/c que receberam 3 e 4 doses da *rPbMTRAP*. Leitura de luminescência 24 horas depois de incubação. Os resultados correspondem à média das Taxas de conversão (Média da Relative luminescence unit (RLU)/Gametocitemia). A barra de erro representa o desvio padrão (Standard Deviation: SD) ** $p < 0,05$ (*t*-Student).

6.6 Estratégia parasitos *PbMTRAP-GFP* (Green Fluorescent Protein)

Com o objetivo de fazer a marcação do gene da *PbMTRAP* para análises posteriores de imagens em tempo real do egresso dos gametócitos, inserimos um cassete de seleção e um de fluorescência de acordo a estratégia mostrada anteriormente (Figura 10).

Todos os insertos foram introduzidos no plasmídeo pBSSk+ e sua presença confirmados mediante análises de restrição com as enzimas específicas para cada inserto (Figura 31). A digestão com as enzimas KpnI – XhoI, permitem confirmar a presença do fragmento do gene *PbMTRAP* (MTRAP1,1) que tem um tamanho de 1.659 pb; as enzimas XhoI – Sall, são específicas para confirmar a sequência da GFP (738 pb); Sall – Eco32I permitem confirmar a segunda parte do gene da *PbMTRAP* (MTRAP 1,2) que apresenta um tamanho de 327 pb; Eco32I – SmaI digerem os extremos do inserto que corresponde ao 3´TRAP e ao cassete de seleção -hDHFR de 2.223 pb; SmaI – NotI confirmam a região 3´*PbMTRAP* de 1.662 pb; e KpnI – NotI liberam o fragmento completo de 6.492 pb (libre de plasmídeo).

7.714 ng do inserto total de 6.492 pb foram transfectados em merozoítos sincronizados em cultura. O acompanhamento das parasitemias nos camundongos foi feito a partir do dia 4 pós-infecção e os parasitos foram transferidos para 4 camundongos naïve no dia 9 pós infecção (Figura 32).

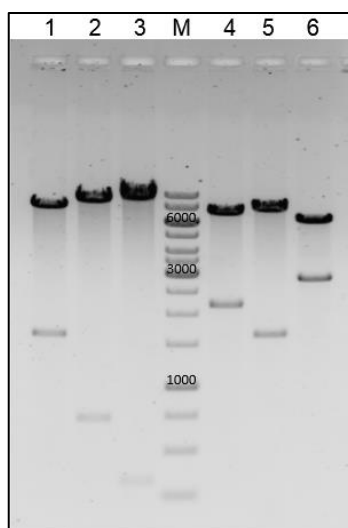


Figura 31. Análises de restrição do plasmídeo dos parasitos *PbMTRAP-GFP*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio corrido durante 45 m e 80 minutos a 100W. Nas linhas 1 – 5 se encontram os diferentes inserto do plasmídeo final digerido com as enzimas respectivas: 1. KpnI – XhoI, MTRAP1,1 = 1.659 pb ; 2. XhoI – Sall, GFP = 738 pb; 3. Sall – Eco32I, MTRAP 1,2 = 327 pb; 4. Eco32I – SmaI, 3´TRAP-Hdhfr = 2.223 pb; 5. SmaI – NotI, 3´MTRAP = 1.662 pb. Na linha 6 se mostra a digestão com a primeira e a última enzima do fragmento completo KpnI – NotI = 6.492 pb. M: Marcador de pesos molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific).

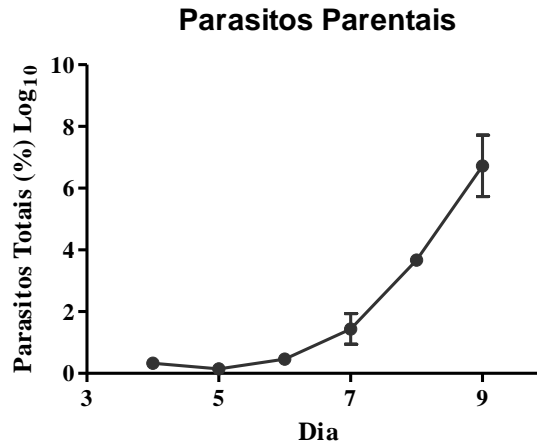


Figura 32. Acompanhamento da Parasitemia dos *PbMTRAP-GFP*. O gráfico mostra a média dos parasitas de dois camundongos injetados com os parasitas transfectados.

Dos 15 camundongos utilizados na clonagem dos parasitos, 4 (A4, A5, C1 e C2) foram positivos no dia dez pós injeção. Os primers para genotipagem dos mutantes foram desenhados como se representado na Figura 10 e Tabela 4. Os primers P1 e P5 alinham fora da região de homologia, e permitirão conferir que o fragmento está inserido no genoma do parasito; os primers P2, P4 e P5 com suas respectivas combinações, permitem a confirmação da presença de cada um dos fragmentos inseridos.

Apesar que os 4 clones foram positivos para a presença da GFP e do cassette de seleção (Figura 33), estes não apresentaram fluorescência nenhuma. Baseados nisso, fizemos um teste de exflagelação e observamos que cada clone *PbMTRAP-GFP*, apresenta uma alteração no fenótipo de gametócitos machos ativados (Figura 34A), similar ao observado em parasitos *PbMTRAP KO* (Figura 34B) (Bargieri et al., 2016). Aparentemente a inserção do gene da GFP se comporta como um nocaute do gene da MTRAP o que estaria ocasionando esta alteração. O passo seguinte é o sequenciamento da região MTRAP 1,1 até a primeira parte do 3' TRAP que inclui a sequência do gene da GFP (Figura 10).

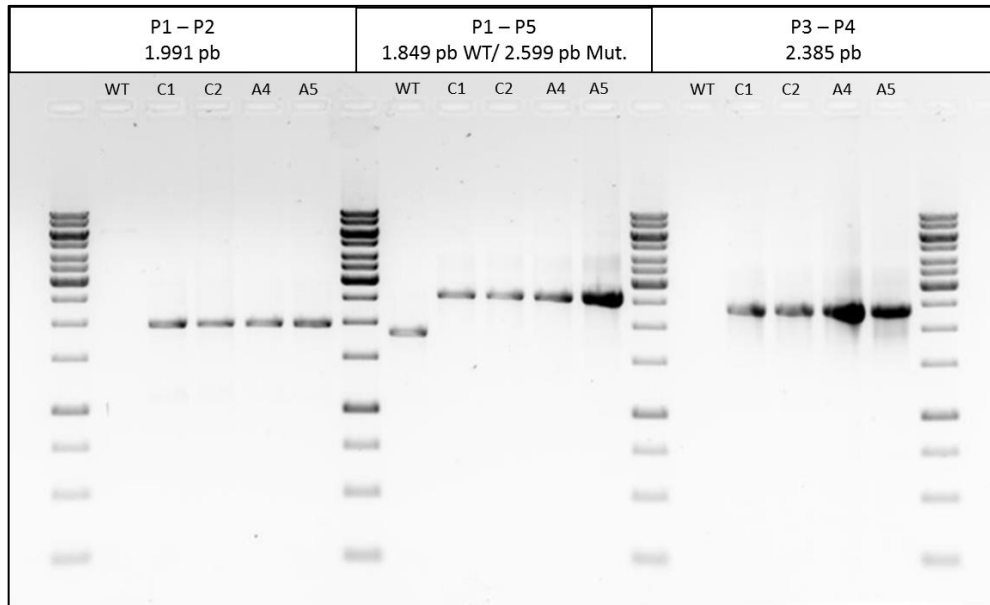


Figura 33. Genotipagem dos parasitos *PbMTRAP*-GFP. Os Primers P1 e P2 não amplificaram as regiões alvo dos parasitos WT, mas amplificam um fragmento de 1.991 pares de bases (pb) nos mutantes. P1 e P5, amplificam um fragmento de 1.849 pb nos parasitos selvagens e nos mutantes um de 2.599 pb. P3 e P4, não amplificam nenhuma região nos parasitos WT e nos mutantes amplificam um fragmento de 2.385 pb. M: Marcador de pesos molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific).

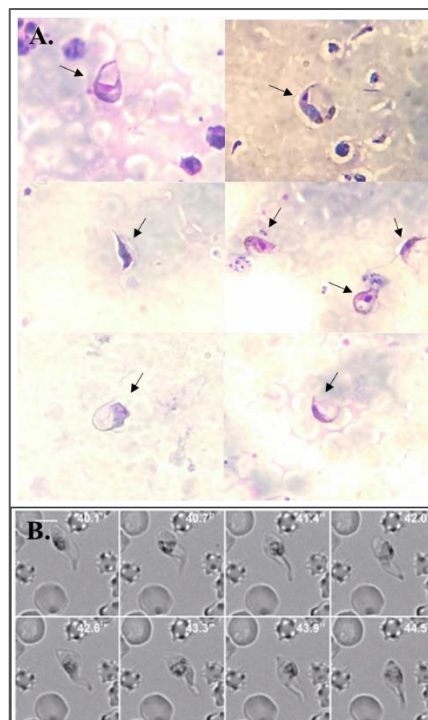


Figura 34. Parasitos transfectados com fenótipo alterado. **A.** Esfregaço de gametócitos macho de parasitos *PbMTRAP*-GFP, depois da ativação. O teste consistiu em colocar 2 μ l de sangue parasitado mais 14 μ l de meio de oocinetos, incubados por 10 minutos a 21 graus. Coloração com panótico rápido, observação 1000x. **B.** Microscopia de lapso de tempo de um gametócito masculino *PbMTRAP* KO ativado. O tempo em segundos é mostrado em cada imagem. Os resultados são representativos de cinco experimentos independentes (Bargieri et al., 2016).

6.7 Testes de infecção de *Anopheles darlingi* colonizado com *P. berghei* ANKA

Um dos grandes obstáculos para estudos de transmissão no Brasil reside no fato de os mosquitos *Anopheles* endêmicos no país serem refratários à infecção por modelos murinos de *Plasmodium*. Com a recente colonização do *An. darlingi*, principal vetor da malária na Região Amazônica, decidimos testar se seria possível infectar essa espécie com *P. berghei*. Para isso utilizamos mosquitos *An. darlingi* obtidos na colônia do laboratório de entomologia da FIOCRUZ Rondônia na cidade de Porto Velho.

6.7.1 Condições da B.O.D.

Para conseguir a sobrevivência tanto do parasito como do vetor, condições de temperatura (21 °C) e umidade (>50 %) foram mantidas controladas dentro da BOD, e registro dos dados foram feitos todos os dias de manhã e ao final do dia. Como se observa na Figura 35, se registrou uma temperatura média de 21 °C e umidade de 66 %, com algumas variações ao longo do tempo.

6.7.2 Ensaios de alimentação direta no camundongo

Em total foram feitos 5 ensaios de alimentação, com uma gametocitemia média de 0,5%. Todas as condições dos ensaios são resumidas na Tabela 5.

Tabela 5. Resumo das condições dos ensaios de alimentação com camundongos infectados com *P. berghei*.

Ensaio	Parasitemia (%)	Gametocitemia (%)	Infecção	Mantido
1	14.28	0.49	B.O.D.	B.O.D.
2	10.6	0.51	Colônia	B.O.D.
3	20.6	0.58	B.O.D.	B.O.D.
4	11.2	0.55	B.O.D.	B.O.D.
5	23	0.56	B.O.D.	B.O.D.

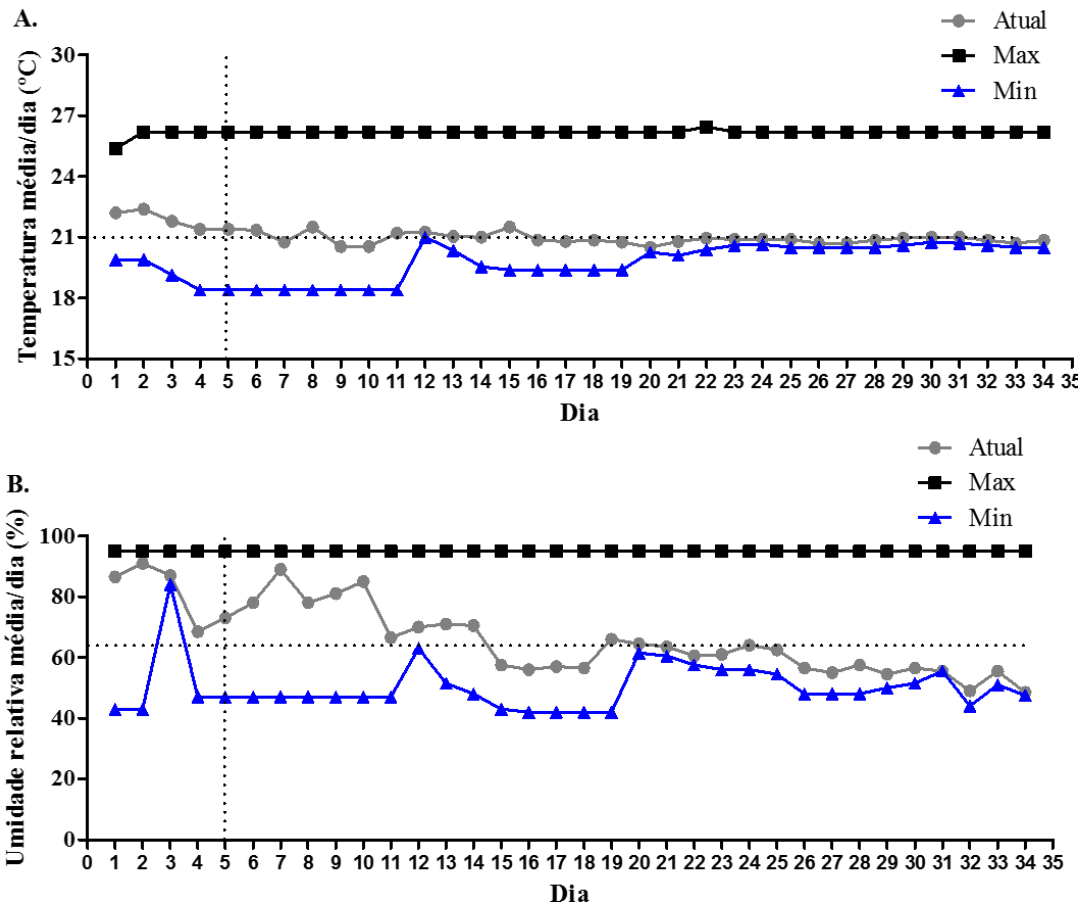


Figura 35. Média dos dados por dia das condições dentro da BOD. **A.** Dados de temperatura; **B.** Dados de umidade.

6.7.3 Dissecções de mosquitos

Uma média de 20 mosquitos foram dissecados para observação de intestinos e 11 para glândulas salivares (Tabela 6). Quanto a presença de parasitos nas estruturas analisadas, não foi possível observar nem esporozoítos nem oocistos nos insetos dissecados (Figura 36).

Tabela 6. Resumo de dissecções.

Ensaio	Dissecção de intestinos		Dissecção de glândulas	
	No. Insetos	Oocistos	No. Insetos	Esporozoítos
1	24	0	9	0
2	22	0	12	0
3	17	0	11	0
4	14	0	14	0
5	28	0	-	-
Total	105	0	46	0

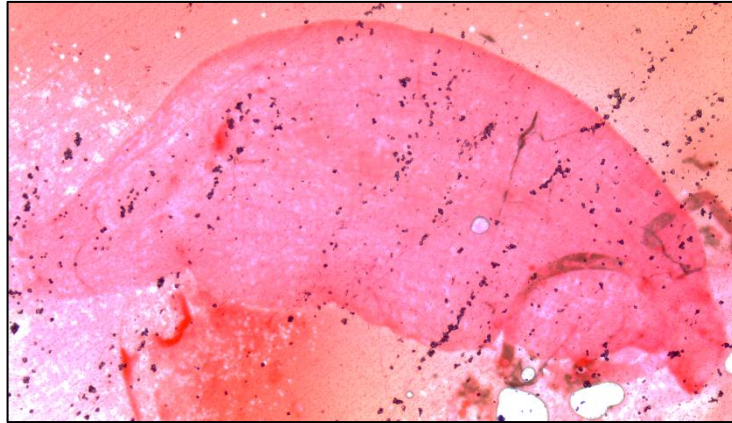


Figura 36. Intestino médio de *An. darlingi*. Intestinos corado com mercurocromo ao 0,2% e observados a 10X.

6.7.4 Injeção do extrato de glândulas no camundongo

Nos dias 20 e 19 pós infecção dos lotes de insetos dos ensaios 1 e 2, respectivamente, foram dissecados para avaliar a presença de esporozoítos. Dois grupos de glândulas (9 glândulas, lote 1; 12 glândulas, lote 2) foram maceradas independentemente em 50 μ l de PBS e depois passadas por filtro em tubo de 1,5 ml. Cada pool foi posto em câmara de Neubauer para a procura e contagem de esporozoítos. Nenhuma forma parasitária foi observada a 40X. Mesmo assim, cada macerado foi injetado via intravenosa em camundongos BALB/c, aos quais fizemos seguimento da parasitemia a partir do dia 3, mas nenhum parasito foi observado no sangue.

7 DISCUSSÃO

A imunidade de bloqueio da transmissão da malária é baseada em anticorpos funcionais contra proteínas de membrana da superfície de estágios sexuais, esporogônicos ou antígenos do intestino do mosquito (Sauerwein & Bousema, 2015). Os antígenos de pré-fertilização são expressos em gametócitos no hospedeiro humano, mas são acessíveis para anticorpos apenas após a gametogênese e egresso dos gametas da célula hospedeira. Estes anticorpos, natural ou experimentalmente adquiridos, podem se ligar aos gametas e impedir a fertilização e posterior formação do zigoto (Sauerwein & Bousema, 2015). Os antígenos pós-fertilização encontram-se expressos no zigoto e no oocineto no intestino do mosquito (Nikolaeva et al., 2015). Como alguns destes antígenos podem ser expressos apenas nos estágios esporogônicos, não teriam um reconhecimento pelo sistema imune humano de forma natural (Sauerwein, 2007). Antígenos do intestino do mosquito também têm sido propostos como alvos de anticorpos que bloqueiam a transmissão (Dinglasan et al., 2007). A interrupção do ciclo de vida do *Plasmodium* representa um aspecto chave como parte das estratégias de controle integral da malária (Goodman et al., 2011). Nesse sentido, escolhemos trabalhar com uma proteína que se mostrava bastante promissora, já que se encontra presente em antígenos de estágio sanguíneo, sexual e esporogônico, que poderia ampliar o espectro de ação como antígeno para interrupção da transmissão da malária.

Através de análise de bioinformática, nós selecionamos a sequência do ectodomínio da *PbMTRAP* para ser expressa como proteína heteróloga em *E. coli*. Para a produção de recombinantes biológicos, *E. coli* ainda se mantém como um sistema de primeira escolha pela sua facilidade e baixo custo. No presente trabalho, nós expressamos e purificamos com êxito a *PbMTRAP* em *E. coli* com alto rendimento seguindo a aplicação da otimização de códons na sequência gênica. O recombinante da *PbMTRAP* foi detectado mediante western blot com anticorpos monoclonais anti-histidina; a banda da proteína foi consistente com o tamanho molecular predito *in silico*.

Para que um antígeno seja efetivo como TBV, o próximo passo crítico é que este consiga sozinho estimular uma alta produção de anticorpos, mesmo com baixas doses da vacina sendo administrada, e finalmente que estes anticorpos bloqueiem o desenvolvimento do parasito no intestino do mosquito (Kumar et al., 2014). Nesta ocasião, utilizamos um método de medição *in vitro*, no qual simulamos as condições do intestino do mosquito. Após imunização de camundongos com 10 µg da proteína recombinante, os títulos de anticorpos anti-*PbMTRAP*

mostraram um aumento significativo nos soros imunes em comparação com os soros controle (camundongos imunizados x camundongos controles). A análise da sequência de 536 aa usada como antígeno da *PbMTRAP* pôde prever 16 determinantes antigênicos para células B (Anexo 1). Embora o recombinante demonstre evidente imunogenicidade e especificidade para reconhecer a proteína nativa mediante Wester Blot e IFA, os anticorpos anti-*PbMTRAP* purificados não tiveram atividade contra a fertilização do parasito *in vitro* nas diferentes concentrações testadas.

Unidades vacinais recombinantes requerem em geral o acompanhamento de um adjuvante para conseguir uma imunidade adequada. A maioria dos estudos iniciais para testar imunogenicidade *in vivo* foram dirigidos usando proteínas recombinantes formuladas com adjuvante de Freund, o qual é conhecido como um potente estimulador da resposta imune *in vivo*, porém, não é adequado para ser usado em humanos (Wu et al., 2015). Por este motivo decidimos mudar de adjuvante.

Quando os ensaios foram realizados sem purificação dos anticorpos e desafiando diretamente os animais imunizados em combinação com o adjuvante Poly (I:C), a formação de oocinetos foi reduzida em 83% e 49% em ensaios de conversão em comparação com o grupo controle (Figura 16B e 18B). Nestes experimentos, os parasitos estiveram em contato com os anticorpos circulantes por um tempo de pelo menos 5 dias, o que pode ter proporcionado algum acesso ao antígeno, mesmo este encontrando-se em estágios intracelulares.

Baseados nestes resultados, e propondo a hipótese de que um possível aumento nos títulos de anticorpos e alteração das proporções das subclasses de IgG estivessem ocasionando a redução na formação de oocinetos, analisamos os títulos de IgG totais, IgG1, IgG2a e IgG2b pré e pós desafio. Como observado por ELISA, as populações de anticorpos foram mantidas quase constantes depois do desafio no grupo imunizado com o recombinante, indicando que não existe uma alteração das populações de IgG total, IgG1 e IgG2a, mas sim uma redução de IgG2b (Figura 21). Estes dados contrastam com o reportado por outros autores que fizeram *boosting* com parasitos. Eles observaram que a infecção de *P. berghei* em camundongos BALB/c não imunizados incrementou as populações das diferentes subclasses de IgG entre os dias 4 e 6 (Hansen et al., 2005). Assim mesmo, Chatterjee e colaboradores (1999), que imunizaram camundongos C57BL/6 com esporozoítos irradiados e depois desafiou-os, encontraram que entre os dias 3 e 10 os títulos para as diferentes subclasses de IgG são elevados e mostrando uma queda destes depois do dia 17. Nossos dados suportam a ideia de que o recombinante, em combinação com o adjuvante, consegue induzir uma resposta

quantitativamente alta, mas mesmo que os estágios sanguíneos do parasito (merozoítos) expressem a MTRAP a infecção pós desafio não reforça a resposta.

Durante a avaliação do potencial de anticorpos purificados antes e após o desafio dos camundongos imunizados com o recombinante em combinação com Poly(I:C) e dos anticorpos circulantes (não purificados) durante o desafio, num ensaio de forma paralela, observamos que com os anticorpos circulantes a conversão média do grupo *PbMTRAP* foi menor que no controle (Figura 22). Assim mesmo, os testes com anticorpos purificados pré desafio, confirmaram o obtido com os ensaios de imunização com IFA, ou seja, estes anticorpos purificados não têm um efeito sobre a formação de oocinetos (Figura 24); mas os anticorpos purificados após o desafio, pertencentes aos mesmos camundongos do ensaio de anticorpos não purificados, apresentaram um efeito bloqueador tanto no grupo imunizados com a *rPbMTRAP* como no grupo controle quando se testaram 500µg/ml de cada grupo de anticorpo (Figura 24). Estes últimos resultados fazem sentido, já que após o desafio a resposta imune é direcionada contra diferentes antígenos de superfície do parasito (o parasito na sua totalidade), e estes anticorpos se convertem em bloqueadores em alta concentração (no estado purificado), mas não especificamente por um efeito da imunização com a proteína teste.

Com a intenção de melhorar a resposta imunológica, fizemos um teste com 4 imunizações em camundongos da linhagem BALB/c, mas não encontramos diferenças estatisticamente significativas nos títulos de anticorpos produzidos nos camundongos que receberam 3 ou 4 doses da proteína recombinante (Figura 27A e B). Outros autores já observaram este mesmo comportamento. Num trabalho de Arévalo-Herrera e colaboradores (2015), se mostra como os títulos de IgG foram mantidos em 6[Log₁₀] antes e depois da quarta imunização com o recombinante da *Pv48/45*. Isso sugere que 3 imunizações conseguem estimular suficientemente o sistema imunológico até o ponto de chegar num estado de saturação.

Temos observado a alta complexidade para o desenvolvimento de ensaio de bloqueio da transmissão em condições *ex vivo*, já que fatores associados a gametocitemias variável em cada camundongo podem influenciar na proporção de oocinetos formados. Com a ideia de começar a fazer os ensaios de bloqueio da transmissão com anticorpos em condições *in vivo*, aproveitando a recente colônia de *An. darlingi* no Brasil (FIOCRUZ-Rondônia), e tendo em conta a susceptibilidade deste vetor na infecção com *Plasmodium*, fizemos teste de alimentação direta de mosquitos sobre camundongos infectados com *P. berghei*, o modelo sobre o qual desenvolvemos toda nossa pesquisa, já que um estudo prévio mostrou a possibilidade da

infecção de *P. berghei* em *An. albimanus* com altas prevalências da infecção no intestino do mosquito (Contreras-Garduño et al., 2015). Por outro lado, a inabilidade de *P. berghei* para infectar outras espécies de *Anopheles* do novo mundo já foi descrita. Orfano e colaboradores (2016), fizeram uma comparação da infecção das espécies de *Plasmodium* murinas, *P. berghei* e *P. yoelii*, em diferentes espécies vetoras colonizadas. Eles observaram que *An. aquasalis* é menos susceptível a infecção com *P. berghei* e *P. yoelii* que *An. albimanus*, sendo que as condições fisiológicas desta espécie não fornecem um ambiente adequado para o desenvolvimento dos parasitos. Nossos resultados sugerem que o *P. berghei* é incapaz de infectar *An. darlingi* e, portanto, inútil para a utilização neste modelo de malária murina.

Uma das limitações chaves no sucesso do desenvolvimento de vacinas para malária é a dificuldade para manter uma proteção durável após a imunização, isso em parte tem sido atribuído à baixa imunogenicidade dos antígenos selecionados, assim como ao efeito evasivo do parasito para ser neutralizado pelo sistema imunológico do hospede. Esforços para incrementar o grau e durabilidade da proteção pelas vacinas incluem teste de novos adjuvantes e plataformas, assim como esquemas de imunização, dosagem e métodos de administração (Coelho et al., 2017). Contudo, uma proteção de longa vida não tem sido conseguida ainda.

A premissa na avaliação de antígenos de bloqueio da transmissão é o teste dos anticorpos induzidos pela vacinação no seu potencial para inibir determinados estágios do parasito. Os títulos de anticorpos induzidos podem ser quantificados através de ELISA antígeno-específico (Miura et al., 2007). Porém, devido à natureza policlonal dos anticorpos induzidos por vacinas baseadas em proteínas recombinantes, o título medido por ELISA por si só pode ser insuficiente para quantificar os níveis de anticorpos específicos para um amplo repertório de epítomos funcionais de uma molécula (Wu et al., 2015). Ou seja, os títulos de anticorpos não devem ser traduzidos em eficácia de vacinas de bloqueio da transmissão, posto que os títulos de anticorpos geralmente variam de um indivíduo a outro. Não obstante, a determinação dos títulos de anticorpos permitem estabelecer um ponto de referência para os títulos de anticorpos que devem ser obter para conseguir um nível definido de TBA (Miura et al., 2007).

Propriedades intrínsecas dos anticorpos têm sido identificadas como fatores determinantes da eficácia protetora da resposta imune (Siegrist, 2018). No caso específico das TBV, além das quantidades dos anticorpos é possível que a TBA dependa da qualidade do mesmo (afinidade, avidéz, especificidade e capacidade de neutralização), por exemplo, diferenças na especificidade e afinidade dos anticorpos podem ser resultado da maturação da resposta tanto como um resultado do “*boosting*” ou como resultado do uso de diferentes

adjuvantes (Miura et al., 2007). No entanto, ainda não é claro se a seleção do adjuvante pode mudar somente a quantidade de anticorpos induzida pela vacina ou também se estes alteram sua qualidade com respeito a atividade de bloqueio da transmissão (Miura et al., 2007). Neste trabalho, com o uso de dois diferentes adjuvantes nós observamos que a resposta (medida em títulos de anticorpos) foi quantitativamente similar e a qualidades dos anticorpos com relação ao bloqueio de transmissão foi baixa. Entretanto, observamos algum efeito inibitório, ainda que certas vezes marginal, sugerindo que a MTRAP possa compor, no futuro, formulações com múltiplos antígenos de fase sexuada, contra os quais a resposta possa agir de maneira sinérgica.

8 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho, nós podemos concluir que a *rPbMTRAP* desencadeia uma forte resposta de anticorpos específicos em camundongos, e estes reconhecem a proteína nativa do parasito. Também é possível concluir que a imunização de camundongos com a *rPbMTRAP* pode reduzir levemente a formação de oocinetos. Nossos resultados também revelam a ineficácia do *P. berghei* para infectar *An. darlingi*.

REFERÊNCIAS

- Agnandji, S. T., Lell, B., Fernandes, J. F., Abossolo, B. P., Methogo, B. G., Kabwende, A. L., Adegnika, A. A., Mordmüller, B., ... Vansadia, P. (2012). A Phase 3 Trial of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine in African Infants. *New England Journal of Medicine*, 367(24), 2284–2295.
- Ahmed, M. A. & Cox-Singh, J. (2015). *Plasmodium knowlesi*-an emerging pathogen. In *ISBT Science Series* (Vol. 10).
- Anstey, N. M., Russell, B., Yeo, T. W., & Price, R. N. (2009). The pathophysiology of vivax malaria. *Trends in Parasitology*, 25(5), 220–227.
- Arévalo-Herrera, M., Solarte, Y., Rocha, L., Álvarez, D., Beier, J. C., & Herrera, S. (2011). Characterization of *Plasmodium vivax* Transmission-Blocking Activity in Low to Moderate Malaria Transmission Settings of the Colombian Pacific Coast. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 84(24), 71–77.
- Arévalo-Herrera, M., Vallejo, A. F., Rubiano, K., Solarte, Y., Marin, C., Castellanos, A., Céspedes, N., & Herrera, S. (2015). Recombinant Pvs48/45 Antigen Expressed in *E. coli* Generates Antibodies that Block Malaria Transmission in *Anopheles albimanus* Mosquitoes. *Plos One*, 10(3), e0119335.
- Ashley, E. A., Pyae Phyo, A., & Woodrow, C. J. (2018). Malaria. *The Lancet*, 391(10130), 1608–1621.
- Ayimba, E., Hegewald, J., Ségbéna, A. Y., Gantin, R. G., Lechner, C. J., Agossou, A., Banla, M., & Soboslay, P. T. (2011). Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical & Experimental Immunology*, 166(2), 218–226.
- Baker, R. P., Wijetilaka, R., & Urban, S. (2006). Two *Plasmodium* Rhomboid Proteases Preferentially Cleave Different Adhesins Implicated in All Invasive Stages of Malaria. *PLoS Pathogens*, 2(10), e113.
- Bargieri, D. Y., Thiberge, S., Tay, C. L., Carey, A. F., Rantz, A., Hischen, F., Lorthiois, A., Straschil, U., ... Ménard, R. (2016). Plasmodium Merozoite TRAP Family Protein Is Essential for Vacuole Membrane Disruption and Gamete Egress from Erythrocytes. *Cell Host & Microbe*, 20(5), 618–630.
- Bartholdson, S. J., Bustamante, L. Y., Crosnier, C., Johnson, S., Lea, S., Rayner, J. C., & Wright, G. J. (2012). Semaphorin-7A Is an Erythrocyte Receptor for *P. falciparum* Merozoite-Specific TRAP Homolog, MTRAP. *PLoS Pathogens*, 8(11).
- Bartoloni, A. & Zammarchi, L. (2012). Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe Malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1), e2012026.
- Baum, J., Richard, D., Healer, J., Rug, M., Krnajski, Z., Gilberger, T., Green, J. L., Holder, A. A., & Cowman, A. F. (2006). A Conserved Molecular Motor Drives Cell Invasion and

Gliding Motility across Malaria Life Cycle Stages and Other Apicomplexan Parasites. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 5197–5208.

- Bell, B. A., Wood, J. F., Bansal, R., Ragab, H., Cargo, J., Washington, M. A., Wood, C. L., Ware, L. A., ... Yadava, A. (2009). Process development for the production of an *E. coli* produced clinical grade recombinant malaria vaccine for *Plasmodium vivax*. *Vaccine*, 27, 1448–1453.
- Bennett, J. W., Yadava, A., Tosh, D., Sattabongkot, J., Komisar, J., Ware, L. A., McCarthy, W. F., Cowden, J. J., ... Ockenhouse, C. F. (2016). Phase 1/2a Trial of *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), e0004423.
- Bousema, T. & Drakeley, C. (2011). Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(2), 377–410.
- Brasil, P., Zalis, M. G., de Pina-Costa, A., Siqueira, A. M., Júnior, C. B., Silva, S., Areas, A. L. L., Pelajo-Machado, M., ... Daniel-Ribeiro, C. T. (2017). Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health*, 5(10), e1038–e1046.
- Buffet, P. A., Safeukui, I., Deplaine, G., Brousse, V., Prendki, V., Thellier, M., Turner, G. D., & Mercereau-Puijalon, O. (2011). The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*, 117(2), 381–392.
- Calit, J., Dobrescu, I., Gaitán, X. A., Borges, M. H., Ramos, M. S., Eastman, R. T., & Bargieri, D. Y. (2018). Screening the Pathogen Box for Molecules Active against *Plasmodium* Sexual Stages Using a New Nanoluciferase-Based. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(11), 1–9.
- Carruthers, V. B. & Sibley, L. D. (1997). Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol.*, 73(2), 114–123.
- Carter, R., Coulson, A., Bhatti, S., Taylor, B. J., & Elliott, J. F. (1995). Predicted disulfide-bonded structures for three uniquely related proteins of *Plasmodium falciparum*, Pfs230, Pfs48/45 and Pf12. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 71(2), 203–210.
- Carvalho, B. O., Lopes, S. C. P., Nogueira, P. A., Orlandi, P. P., Bargieri, D. Y., Blanco, Y. C., Mamoni, R., Leite, J. A., ... Costa, F. T. M. (2010). On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax* –Infected Erythrocytes. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(4), 638–647.
- Chatterjee, S., Druilhe, P., & Wery, M. (1999). Irradiated sporozoites prime mice to produce high antibody titres upon viable *Plasmodium berghei* sporozoite challenge, which act upon liver-stage development. *Parasitology*, 118(3), 219–225.
- Chenet, S. M., Akinyi Okoth, S., Huber, C. S., Chandrabose, J., Lucchi, N. W., Talundzic, E., Krishnalall, K., Ceron, N., ... Udhayakumar, V. (2016). Independent Emergence of the *Plasmodium falciparum* Kelch Propeller Domain Mutant Allele C580Y in Guyana.

Journal of Infectious Diseases, 213(9), 1472–1475.

- Cheng, Y., Ito, D., Sattabongkot, J., Lim, C. S., Kong, D.-H., Ha, K.-S., Wang, B., Tsuboi, T., & Han, E.-T. (2013). Serological responses to a soluble recombinant chimeric *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein in VK210 and VK247 population. In *Malaria Journal* (Vol. 12).
- Clyde, D. F., Most, H., McCarthy, V. C., & Vanderberg, J. P. (1973). Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria. *The American Journal of the Medical Sciences*, 266(3), 169–177.
- Coelho, C. H., Doritchamou, J. Y. A., Zaidi, I., & Duffy, P. E. (2017). Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium. *Npj Vaccines*, 2(1), 34.
- Conn, J. E., Grillet, M. E., Correa, M., & Sallum, M. A. M. (2018). Malaria Transmission in South America—Present Status and Prospects for Elimination. *Towards Malaria Elimination - A Leap Forward*.
- Contreras-Garduño, J., Rodríguez, M. C., Hernández-Martínez, S., Martínez-Barnette, J., Alvarado-Delgado, A., Izquierdo, J., Herrera-Ortiz, A., Moreno-García, M., ... Lanz-Mendoza, H. (2015). *Plasmodium berghei* induced priming in *Anopheles albimanus* independently of bacterial co-infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 52(2), 172–181.
- Cowman, A. F. & Foote, S. J. (1990). Chemotherapy and drug resistance in malaria. *International Journal for Parasitology*, 20(4), 503–513.
- Curtis, G. F., Miller, J. E., Hodjati, M. H., Kolaczinski, J. H., & Kasumba, I. (1998). Can anything be done to maintain the effectiveness of pyrethroid-impregnated bednets against malaria vectors? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353(1376), 1769–1775.
- Dame, J. B., Williams, J. L., McCutchan, T. F., Weber, J. L., Wirtz, R. A., Hockmeyer, W. T., Maloy, W. L., Haynes, J. D., ... Miller, L. H. (1984). Structure of the Gene Encoding the Immunodominant Surface Antigen on the Sporozoite of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 225(4662), 593–599.
- De Camargo, T. M., de Freitas, E. O., Gimenez, A. M., Lima, L. C., de Almeida Caramico, K., Françoso, K. S., Bruna-Romero, O., Andolina, C., ... Soares, I. S. (2018). Prime-boost vaccination with recombinant protein and adenovirus-vector expressing *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (CSP) partially protects mice against Pb/Pv sporozoite challenge. *Scientific Reports*, 8(1), 1118.
- Deane, L. M. (1992). Simian malaria in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 87, 1–20.
- Dessens, J. T., Beetsma, A. L., Dimopoulos, G., Wengelnik, K., Crisanti, A., Kafatos, F. C., & Sinden, R. E. (1999). CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *The EMBO Journal*, 18(22), 6221–6227.

- Diaz, S. A., Martin, S. R., Grainger, M., Howell, S. A., Green, J. L., & Holder, A. A. (2014). *Plasmodium falciparum* aldolase and the C-terminal cytoplasmic domain of certain apical organellar proteins promote actin polymerization. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *197*(1–2), 9–14.
- Dinglasan, R. R., Kalume, D. E., Kanzok, S. M., Ghosh, A. K., Muratova, O., Pandey, A., & Jacobs-Lorena, M. (2007). Disruption of *Plasmodium falciparum* development by antibodies against a conserved mosquito midgut antigen. *PNAS*, *104*(33), 13461–13466.
- Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A. P., Tarning, J., Lwin, K. M., Arie, F., ... White, N. J. (2009). Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *New England Journal of Medicine*, *361*(5), 455–467.
- Douglas, A. D., Baldeviano, G. C., Lucas, C. M., Lugo-Roman, L. A., Crosnier, C., Bartholdson, S. J., Diouf, A., Miura, K., ... Draper, S. J. (2015). A PfRH5-Based Vaccine Is Efficacious against Heterologous Strain Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Infection in Aotus Monkeys. *Cell Host & Microbe*, *17*(1), 130–139.
- Douglas, A. D., Williams, A. R., Illingworth, J. J., Kamuyu, G., Biswas, S., Goodman, A. L., Wyllie, D. H., Crosnier, C., ... Draper, S. J. (2011). The blood-stage malaria antigen PfRH5 is susceptible to vaccine-inducible cross-strain neutralizing antibody. *Nature Communications*, *2*(1), 601.
- Doumbo, O. K., Niaré, K., Healy, S. A., Sagara, I., Duffy, P. E., Healy, S. A., & Duffy, P. E. (2018). Malaria Transmission-Blocking Vaccines: Present Status and Future Perspectives. In *Towards Malaria Elimination - A Leap Forward: Vol. i* (p. 13).
- Draper, S. J., Angov, E., Horii, T., Miller, L. H., Srinivasan, P., Theisen, M., & Biswas, S. (2015). Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines. *Vaccine*, *33*(52), 7433–7443.
- Draper, S. J., Sack, B. K., King, C. R., Nielsen, C. M., Rayner, J. C., Higgins, M. K., Long, C. A., & Seder, R. A. (2018). Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. *Cell Host & Microbe*, *24*(1), 43–56.
- Ewer, K. J., O'Hara, G. A., Duncan, C. J. A., Collins, K. A., Sheehy, S. H., Reyes-Sandoval, A., Goodman, A. L., Edwards, N. J., ... Hill, A. V. S. (2013). Protective CD8⁺ T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation. *Nature Communications*, *4*(1), 2836.
- Farrance, C. E., Rhee, A., Jones, R. M., Musiyuchuk, K., Shamloul, M., Sharma, S., Mett, V., Chichester, J. A., ... Yusibov, V. (2011). A plant-produced Pfs230 vaccine candidate blocks transmission of *Plasmodium falciparum*. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, *18*(8), 1351–1357.
- Ferreira, M. U. & Castro, M. C. (2016). Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malaria Journal*, *15*(1), 284.

- Freund, J., Sommer, H. E., & Walter, A. W. (1943). Immunization of *Rhesus monkeys* against malaria infection (*P. knowlesi*) with killed parasites and adjuvants. *Science (New York, N.Y.)*, *102*(2643), 202.
- Genton, B., D'Acromont, V., Rare, L., Baea, K., Reeder, J. C., Alpers, M. P., & Müller, I. (2008). *Plasmodium vivax* and Mixed Infections Are Associated with Severe Malaria in Children: A Prospective Cohort Study from Papua New Guinea. *PLoS Medicine*, *5*(6), e127.
- Goodman, A. L., Blagborough, A. M., Biswas, S., Wu, Y., & Hill, A. V. (2011). A Viral Vectored Prime-Boost Immunization Regime Targeting the Malaria Pfs25 Antigen Induces Transmission-Blocking Activity. *PLoS ONE*, *6*(12), 1–11.
- Greenwood, B. & Targett, G. (2009). Do we still need a malaria vaccine? *Parasite Immunology*, *31*(9), 582–586.
- Gregory, J. A., Li, F., Tomosada, L. M., Cox, C. J., Topol, A. B., Vinetz, J. M., & Mayfield, S. (2012). Algae-Produced Pfs25 Elicits Antibodies That Inhibit Malaria Transmission. *PLoS ONE*, *7*(5), e37179.
- Griffith, M. E. (1966). The World-Wide Malaria Eradication Program. *Bulletin of the Entomological Society of America*, *12*(2), 130–136.
- Hansen, D. S., Evans, K. J., D'Ombra, M. C., Bernard, N. J., Sexton, A. C., Buckingham, L., Scalzo, A. A., & Schofield, L. (2005). The Natural Killer Complex Regulates Severe Malarial Pathogenesis and Influences Acquired Immune Responses to *Plasmodium berghei* ANKA. *Infection and Immunity*, *73*(4), 2288–2297.
- Heggenhougen, H. K., Hackethal, V., & Vivek, P. (2003). *The behavioural and social aspects of malaria and its control* (Vol. 03.1; UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases (TDR), Ed.).
- Herrera, S., Bonelo, A., Liliana Perlaza, B., Zully Valencia, A., Cifuentes, C., Hurtado, S., Quintero, G., Alejandro López, J., ... Arévalo-Herrera, M. (2004). Use of long synthetic peptides to study the antigenicity and immunogenicity of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein. *International Journal for Parasitology*, *34*(13–14), 1535–1546.
- Hjerrild, K. A., Jin, J., Wright, K. E., Brown, R. E., Marshall, J. M., Labbé, G. M., Silk, S. E., Cherry, C. J., ... Draper, S. J. (2016). Production of full-length soluble *Plasmodium falciparum* RH5 protein vaccine using a *Drosophila melanogaster* Schneider 2 stable cell line system. *Scientific Reports*, *6*(1), 30357.
- Hoffman, S. L., Vekemans, J., Richie, T. L., & Duffy, P. E. (2015). The march toward malaria vaccines. *Vaccine*, *33*, D13–D23.
- Huang, F., Takala-Harrison, S., Jacob, C. G., Liu, H., Sun, X., Yang, H., Nyunt, M. M., Adams, M., ... Plowe, C. V. (2015). A Single Mutation in K13 Predominates in Southern China and Is Associated With Delayed Clearance of *Plasmodium falciparum* Following Artemisinin Treatment. *Journal of Infectious Diseases*, *212*(10), 1629–1635.

- Invivogen. (2019a). IFA Incomplete Freund's adjuvant. <http://www.invivogen.com/ifa>.
- Invivogen. (2019b). Poly(I:C) HMW High Molecular Weight. Synthetic analog of dsRNA - TLR3 ligand. <http://www.invivogen.com/polyic-hmw>.
- Janse, C. J., Ramesar, J., & Waters, A. P. (2006). High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nature Protocols*, *1*(1), 346–356.
- Jones, R. M., Chichester, J. A., Manceva, S., Gibbs, S. K., Musiychuk, K., Shamloul, M., Norikane, J., Streatfield, S. J., ... Yusibov, V. (2015). A novel plant-produced Pfs25 fusion subunit vaccine induces long-lasting transmission blocking antibody responses. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *11*(1), 124–132.
- Kappe, S., Bruderer, T., Gantt, S., Fujioka, H., Nussenzweig, V., & Ménard, R. (1999). Conservation of a Gliding Motility and Cell Invasion Machinery in Apicomplexan Parasites. *The Journal of Cell Biology*, *147*(5), 937–944.
- Kappe, S., Buscaglia, C. A., & Nussenzweig, V. (2004). PLASMODIUM SPOROZOITE MOLECULAR CELL BIOLOGY. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *20*(1), 29–59.
- Kapulu, M. C., Da, D. F., Miura, K., Li, Y., Blagborough, A. M., Churcher, T. S., Nikolaeva, D., Williams, A. R., ... Biswas, S. (2015). Comparative assessment of transmission-blocking vaccine candidates against *Plasmodium falciparum*. *Scientific Reports*, *5*, 11193.
- Kaslow, D. C. & Biernaux, S. (2015). RTS,S: Toward a first landmark on the Malaria Vaccine Technology Roadmap. *Vaccine*, *33*(52), 7425–7432.
- Kaslow, D.C. & Shiloach, J. (1994). Production, purification and immunogenicity of a malaria transmission-blocking vaccine candidate: TBV25H expressed in yeast and purified using nickel-NTA agarose. *Bio/Technology (Nature Publishing Company)*, *12*(5), 494–499.
- Kaslow, David C., Quakyi, I. A., Syin, C., Raum, M. G., Keister, D. B., Coligan, J. E., McCutchan, T. F., & Miller, L. H. (1988). A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature*, *333*(6168), 74–76.
- Kubler-Kielb, J., Majadly, F., Wu, Y., Narum, D. L., Guo, C., Miller, L. H., Shiloach, J., Robbins, J. B., & Schneerson, R. (2007). Long-lasting and transmission-blocking activity of antibodies to *Plasmodium falciparum* elicited in mice by protein conjugates of Pfs25. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(1), 293–298.
- Kumar, R., Angov, E., & Kumar, N. (2014). Potent Malaria Transmission-Blocking Antibody Responses Elicited by *Plasmodium falciparum* Pfs25 Expressed in *Escherichia coli* after Successful Protein Refolding. *Infection and Immunity*, *82*(4), 1453–1459.
- Lana, R. M., Riback, T. I. S., Lima, T. F. M., da Silva-Nunes, M., Cruz, O. G., Oliveira, F. G. S., Moresco, G. G., Honório, N. A., & Codeço, C. T. (2017). Socioeconomic and demographic characterization of an endemic malaria region in Brazil by multiple correspondence analysis. *Malaria Journal*, *16*(1), 397.

- Laveran, A. (1881). Un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre: origine parasitaire des accidents de l'impaludisme. *Bull Mém Soc Méd Hôpitaux*, 158–164.
- Li, Y., Leneghan, D. B., Miura, K., Nikolaeva, D., Brian, I. J., Dicks, M. D. J., Fyfe, A. J., Zakutansky, S. E., ... Biswas, S. (2016). Enhancing immunogenicity and transmission-blocking activity of malaria vaccines by fusing Pfs25 to IMX313 multimerization technology. *Scientific Reports*, 6, 18848.
- Limviroj, W., Yano, K., Yuda, M., Ando, K., & Chinzei, Y. (2002). Immuno-electron microscopic observation of *Plasmodium berghei* CTRP localization in the midgut of the vector mosquito *Anopheles stephensi*. - PubMed - NCBI. *J Parasitol.* , 88(4), 664–672.
- López, C., Yepes-Pérez, Y., Hincapié-Escobar, N., Díaz-Arévalo, D., & Patarroyo, M. A. (2017). What Is Known about the Immune Response Induced by *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Candidates? *Frontiers in Immunology*, 8, 126.
- malERA. (2017a). malERA: An updated research agenda for diagnostics, drugs, vaccines, and vector control in malaria elimination and eradication. *PLOS Medicine*, 14(11), e1002455.
- malERA. (2017b). malERA: An updated research agenda for insecticide and drug resistance in malaria elimination and eradication. *PLoS Medicine*, 14(11), 1–16.
- malERA. (2017c). malERA: An updated research agenda for malaria elimination and eradication. *PLOS Medicine*, 14(11), e1002456.
- Marrelli, M. T., Malafronte, R. S., Sallum, M. A., & Natal, D. (2007). Kerteszia subgenus of *Anopheles* associated with the Brazilian Atlantic rainforest: current knowledge and future challenges. *Malaria Journal*, 6(1), 127.
- Marsh, K., Forster, D., Waruiru, K., Mwangi, I., Winstanley, M., Marsh, V., Newton, C., Winstanley, P., ... Snow, R. (1995). Indicators Of Life-Threatening Malaria In African Children. *The New England Journal of Medicine*, 332(21), 1399–1404.
- Martin, T. C. S. & Vinetz, J. M. (2018). Asymptomatic *Plasmodium vivax* parasitaemia in the low-transmission setting: The role for a population-based transmission-blocking vaccine for malaria elimination. *Malaria Journal*, 17(1), 1–7.
- Martins, K. A. A. O., Bavari, S., & Salazar, A. M. (2015). Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. *Expert Review of Vaccines*, 14(3), 447–459.
- Matuschewski, K. & Mueller, A.-K. (2007). Vaccines against malaria - an update. *FEBS Journal*, 274(18), 4680–4687.
- Mauduit, M., Snounou, G., Peng, K., Goh, Y. S., & Rénia, L. (2018). Assessing Malaria Vaccine Efficacy. *Towards Malaria Elimination - A Leap Forward*.
- Mcconkey, S. J., Reece, W. H. H., Moorthy, V. S., Webster, D., Dunachie, S., Butcher, G., Vuola, J. M., Blanchard, T. J., ... Hill, A. V. S. (2003). South Parks Road, Oxford OX1 3RE, UK. 4 Malaria Vaccine Program. *Nature Medicine*, 9(6), 729–735.

- Ménard, R. (2000). The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. *Microbes and Infection*, 2(6), 633–642.
- Ménard, Robert. (2001). Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. Microreview. *Cellular Microbiology*, 3(2), 63–73.
- Ménard, Robert, Tavares, J., Cockburn, I., Markus, M., Zavala, F., & Amino, R. (2013). Looking under the skin: The first steps in malarial infection and immunity. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 701–712.
- Milek, R. L., Roeffen, W. F., Kocken, C. H., Jansen, J., Kaan, A. M., Eling, W. M., Sauerwein, R. W., & Konings, R. N. (1998). Immunological properties of recombinant proteins of the transmission blocking vaccine candidate, Pfs48/45, of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* produced in *Escherichia coli*. *Parasite Immunology*, 20(8), 377–385.
- Milek, R. L., Stunnenberg, H. G., & Konings, R. N. (2000). Assembly and expression of a synthetic gene encoding the antigen Pfs48/45 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in yeast. *Vaccine*, 18(14), 1402–1411.
- Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X., & Wellems, T. E. (2013). Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature Medicine*, 19(2), 156–167.
- Miller, L. H., Mason, S. J., Clyde, D. F., & McGinniss, M. H. (1976). The Resistance Factor to *Plasmodium vivax* in Blacks. *New England Journal of Medicine*, 295(6), 302–304.
- Miura, K., Keister, D. B., Muratova, O. V., Sattabongkot, J., Long, C. A., & Saul, A. (2007). Transmission-blocking activity induced by malaria vaccine candidates Pfs25/Pvs25 is a direct and predictable function of antibody titer. *Malaria Journal*, 6(1), 107.
- Morrisette, N. S. & Sibley, L. D. (2002). Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 66(1), 21–38.
- Neafsey, D. E., Juraska, M., Bedford, T., Benkeser, D., Valim, C., Griggs, A., Lievens, M., Abdulla, S., ... Wirth, D. F. (2015). Genetic Diversity and Protective Efficacy of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine. *The New England Journal of Medicine*, 373(21), 2025-37.
- NIH. (2011). Malaria Prevention, Treatment, and Control Strategies | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases. <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/malaria-strategies>.
- Nikolaeva, D., Draper, S. J., & Biswas, S. (2015). Toward the development of effective transmission-blocking vaccines for malaria. *Expert Review of Vaccines*, 14(5), 653–680.
- Noedl, H., Se, Y., Schaecher, K., Smith, B. L., Socheat, D., & Fukuda, M. M. (2008). Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *New England Journal of Medicine*, 359(24), 2619–2620.
- Nosten, F., McGready, R., Simpson, J. A., Thwai, K. L., Balkan, S., Cho, T., Hkirijaroen, L., Looareesuwan, S., & White, N. J. (1999). Effects of *Plasmodium vivax* malaria in

- pregnancy. *Lancet (London, England)*, 354(9178), 546–549.
- Ntumngia, F. B. & Adams, J. H. (2012). Design and Immunogenicity of a Novel Synthetic Antigen Based on the Ligand Domain of the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(1), 30–36.
- Nussenzweig, R. s., Vanderberg, J., Most, H., & Orton, C. (1967). Protective Immunity produced by the Injection of X-irradiated Sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*, 216, 160–162.
- Ogwang, C., Kimani, D., Edwards, N. J., Roberts, R., Mwacharo, J., Bowyer, G., Bliss, C., Hodgson, S. H., ... Bejon, P. (2015). Prime-boost vaccination with chimpanzee adenovirus and modified vaccinia Ankara encoding TRAP provides partial protection against *Plasmodium falciparum* infection in Kenyan adults. *Science Translational Medicine*, 7(286), 286re5-286re5.
- Olliaro, P. L., Barnwell, J. W., Barry, A., Mendis, K., Mueller, I., Reeder, J. C., Shanks, G. D., Snounou, G., & Wongsrichanalai, C. (2016). Implications of *Plasmodium vivax* biology for control, elimination, and research. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(Suppl 6), 4–14.
- Orfano, A. S., Duarte, A. P. M., Molina-Cruz, A., Pimenta, P. F., & Barillas-Mury, C. (2016). *Plasmodium yoelii* nigeriensis (N67) is a robust animal model to study malaria transmission by South American anopheline mosquitoes. *PLoS ONE*, 11(12), 1–15.
- Ouattara, A. & Laurens, M. B. (2015). Vaccines Against Malaria. *Clinical Infectious Diseases*, 60(6), 930–936.
- Outchkourov, N., Vermunt, A., Jansen, J., Kaan, A., Roeffen, W., Teelen, K., Lasonder, E., Braks, A., ... Stunnenberg, H. G. (2007). Epitope Analysis of the Malaria Surface Antigen Pfs48/45 Identifies a Subdomain That Elicits Transmission Blocking Antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 282(23), 17148–17156.
- PATH. (2010). Clinical trials: Steps in malaria vaccine development. *PATH-MVI, The PATH Malaria Vaccine Initiative*, 3–5.
- Pina-Costa, A., Brasil, P., Sílvia, / +, Santi, M. Di, Pereira De Araujo, M., Cecilia Suárez-Mutis, M., Faria, A. C., Santelli, S., ... Daniel-Ribeiro, T. (2014). Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 109(5), 618–634.
- Potocnjak, P., Yoshida, N., Nussenzweig, R. S., & Nussenzweig, V. (1980). Monovalent fragments (fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. *Journal of Experimental Medicine*, 151(6), 1504–1513.
- Read, D., Lensen, A. H., Begarnie, S., Haley, S., Raza, A., & Carter, R. (1994). Transmission-blocking antibodies against multiple, non-variant target epitopes of the *Plasmodium falciparum* gamete surface antigen Pfs230 are all complement-fixing. *Parasite Immunology*, 16(10), 511–519.

- Roeffen, W., Lensen, T., Mulder, B., Teelen, K., Sauerwein, R., Van Druten, J., Eling, W., Meuwissen, J. H., & Beckers, P. J. (1995). A Comparison of Transmission-Blocking Activity with Reactivity in a *Plasmodium falciparum* 48/45-kD Molecule-Specific Competition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(1), 60–65.
- Rogerson, S. J. (2017). Management of malaria in pregnancy. *The Indian Journal of Medical Research*, 146(3), 328–333.
- Rosenberg, R., Wirtz, R. A., Lanar, D. E., Sattabongkot, J., Hall, T., Waters, A. P., & Prasiitisuk, C. (1989). Circumsporozoite Protein Heterogeneity in the Human Malaria Parasite *Plasmodium vivax*. *Science*, 245.
- RTS. (2015). Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *The Lancet*, 386(9988), 31–45.
- Sabchareon, A., Bouharoun-Tayoun, H., Chongsuphajaisiddhi, T., Chantavanich, P., Druilhe, P., Attanath, P., Burnouf, T., Foucault, C., & Ouattara, D. (1991). Parasitologic and Clinical Human Response to Immunoglobulin Administration in Falciparum Malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45(3), 297–308.
- Sauerwein, R. W. (2007). Malaria transmission-blocking vaccines: the bonus of effective malaria control. *Microbes and Infection*, 9(6), 792–795.
- Sauerwein, R. W. & Bousema, T. (2015). Transmission blocking malaria vaccines: Assays and candidates in clinical development. *Vaccine*, 33(52), 7476–7482.
- Saul, A., Lawrence, G., Smillie, A., Rzepczyk, C. M., Reed, C., Taylor, D., Anderson, K., Stowers, A., ... Stué, D. (1999). Human phase I vaccine trials of 3 recombinant asexual stage malaria antigens with Montanide ISA720 adjuvant p. *Vaccine*, 17, 3145–3159.
- Sherman, I. W. (2001). Malaria. *Encyclopedia Of Life Sciences*, 1, 1–5.
- Siegrist, C. A. (2018). Plotkin's Vaccines. In *Plotkin's Vaccines* (7th ed., pp. 16-34.e7).
- Singh, K., Mukherjee, P., Shakri, A. R., Singh, A., Pandey, G., Bakshi, M., Uppal, G., Jena, R., ... Chitnis, C. E. (2018). Malaria vaccine candidate based on Duffy-binding protein elicits strain transcending functional antibodies in a Phase I trial. *Npj Vaccines*, 3(1), 48.
- Smith, J. D., Rowe, J. A., Higgins, M. K., & Lavstsen, T. (2014). Malaria's Deadly Grip: Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum* Infected Erythrocytes. *Cell Microbiol.*, 15(12), 1–13.
- Srinivasan, P., Baldeviano, G. C., Miura, K., Diouf, A., Ventocilla, J. A., Leiva, K. P., Lugo-Roman, L., Lucas, C., ... Miller, L. H. (2017). A malaria vaccine protects Aotus monkeys against virulent *Plasmodium falciparum* infection. *Npj Vaccines*, 2(1), 14.
- Stapleton, D. H. (2004). Lessons of history? Anti-malaria strategies of the international health board and the rockefeller foundation from the 1920s to the era of DDT. *Public Health*

Chronicles, 119, 206–215.

- Sultan, A. A., Thathy, V., De Koning-Ward, T. F., & Nussenzweig, V. (2001). Complementation of *Plasmodium berghei* TRAP knockout parasites using human dihydrofolate reductase gene as a selectable marker. *Mol Biochem Parasitol.*, 113(1), 151–156.
- Sultan, A. A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K. J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R. S., & Ménard, R. (1997). TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. *Cell*, 90(3), 511–522.
- Taylor, T. E. & Molyneux, M. E. (2015). The pathogenesis of pediatric cerebral malaria: eye exams, autopsies, and neuroimaging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1342(1), 44–52.
- Templeton, T. J., Kaslow, D. C., & Fidock, D. A. (2000). Developmental arrest of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* within the mosquito midgut via CTRP gene disruption. *Molecular Microbiology*, 36(1), 1–9.
- Theisen, M., Jore, M. M., & Sauerwein, R. (2017). Towards clinical development of a Pfs48/45-based transmission blocking malaria vaccine. *Expert Review of Vaccines*, 16(4), 329–336.
- Theisen, M., Roeffen, W., Singh, S. K., Andersen, G., Amoah, L., van de Vegte-Bolmer, M., Arens, T., Tiendrebeogo, R. W., ... Sauerwein, R. (2014). A multi-stage malaria vaccine candidate targeting both transmission and asexual parasite life-cycle stages. *Vaccine*, 32(22), 2623–2630.
- Thera, M. A., Doumbo, O. K., Coulibaly, D., Laurens, M. B., Ouattara, A., Kone, A. K., Guindo, A. B., Traore, K., ... Biologicals, G. (2011). A Field Trial to Assess a Blood-Stage Malaria Vaccine A b s t r a c t. In *N Engl J Med* (Vol. 365).
- Trottein, F., Triglia, T., & Cowman, A. F. (1995). Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and plasmodia. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 74(2), 129–141.
- Tun, K. M., Imwong, M., Lwin, K. M., Win, A. A., Hlaing, T. M., Hlaing, T., Lin, K., Kyaw, M. P., ... Woodrow, C. J. (2015). Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: a cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(4), 415–421.
- Turner, L., Lavstsen, T., Berger, S. S., Wang, C. W., Petersen, J. E. V, Avril, M., Brazier, A. J., Freeth, J., ... Theander, T. G. (2013). Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature*, 498.
- Vallejo, A. F., Rubiano, K., Amado, A., Krystosik, A. R., Herrera, S., & Arévalo-Herrera, M. (2016). Optimization of a Membrane Feeding Assay for *Plasmodium vivax* Infection in *Anopheles albimanus*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(6), e0004807.
- Van-Dijk, M. R., Janse, C. J., Thompson, J., Waters, A. P., Braks, J. A. M., Dodemont, H. J.,

- Stunnenberg, H. G., Van Gemert, G.-J., ... Eling, W. (2001). A Central Role for P48/45 in Malaria Parasite Male Gamete Fertility The central role of zygote formation in the life cycle and transmission of the parasite makes gametes and. In *Cell* (Vol. 104).
- Vreden, S. G., Jitan, J. K., Bansie, R. D., & Adhin, M. R. (2013). Evidence of an increased incidence of day 3 parasitaemia in Suriname: an indicator of the emerging resistance of *Plasmodium falciparum* to artemether. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(8), 968–973.
- White, N. J. & Olliaro, P. L. (1996). Strategies for the prevention of antimalarial drug resistance: rationale for combination chemotherapy for malaria. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 12(10), 399–401.
- White, Nicholas J, Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A., & Dondorp, A. M. (2014). Malaria. *The Lancet*, 383(9918), 723–735.
- Wiley, S. R., Raman, V. S., Desbien, A., Bailor, H. R., Bhardwaj, R., Shakri, A. R., Reed, S. G., Chitnis, C. E., & Carter, D. (2011). Targeting TLRs Expands the Antibody Repertoire in Response to a Malaria Vaccine. *Science Translational Medicine*, 3(93), 93ra69-93ra69.
- Williamson, K. C. (2003). Pfs230: from malaria transmission-blocking vaccine candidate toward function. *Parasite Immunology*, 25(7), 351–359.
- Williamson, K. C., Keister, D. B., Muratova, O., & Kaslow, D. C. (1995). Recombinant Pfs230, a *Plasmodium falciparum* gametocyte protein, induces antisera that reduce the infectivity of *Plasmodium falciparum* to mosquitoes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 75(1), 33–42.
- World Health Organization (WHO). (2010). Malaria. In *World Health Organization Technical Report Series No 936*.
- World Health Organization (WHO). (2014a). *Policy brief on malaria diagnostics in low-transmission settings*.
- World Health Organization (WHO). (2014b). *Review of current evidence on combining indoor residual spraying and long-lasting insecticidal nets*.
- World Health Organization (WHO). (2017). *World Malarial Report 2017*.
- World Health Organization (WHO). (2018). *World Malaria Report 2018*.
- World Health Organization (WHO). (2019). *The E-2020 initiative of 21 malaria-eliminating countries, 2019 progress report*.
- Wright, K. E., Hjerrild, K. A., Bartlett, J., Douglas, A. D., Jin, J., Brown, R. E., Illingworth, J. J., Ashfield, R., ... Higgins, M. K. (2014). Structure of malaria invasion protein RH5 with erythrocyte basigin and blocking antibodies. *Nature*, 515(7527), 427–430.
- Wu, Y., Sinden, R. E., Churcher, T. S., Tsuboi, T., & Yusibov, V. (2015). Development of Malaria Transmission-Blocking Vaccines: From Concept to Product. *Advances in Parasitology*, 89, 109–152.

ANEXO

Anexo A. Predição de epítomos para células B na sequência da *PbMTRAP*.

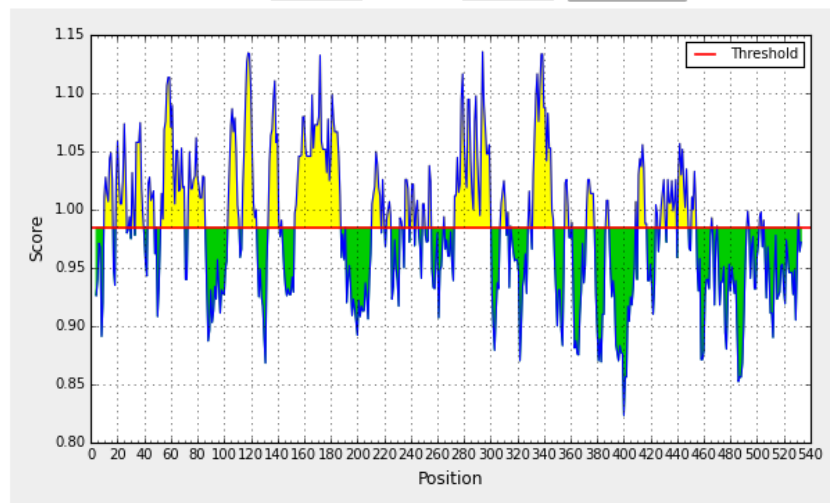
Kolaskar & Tongaonkar Antigenicity Results

Input Sequences

```

1 NETCDNMGPW GPCSNQITTR TCLTNTSLIE KENC SQCKEW SEWLECKDGG RSRHIINCPF
61 IIETQDCITD INGEIVYKKN RVIFDMPD SENKQKYN S NESTIKPHFL QSQDNSQPVL
121 IQASEQKAPN NQEGGTVSVS TPSSPDTSTD TSTGSSMVA S S QSVGSS QSVASSQAVD
181 SSQGVSVQVK GVDNSQNPQK EGESEKANT ESQEKSPIA AEGQKVEGQK AEGKIEETVE
241 GKVE EASP KSATDKGVSG DGVNETDASR ADASGANASG TVASEAVASE TVASGTVASG
301 EVVAKEGTS D DNAAGVSKEK DSKVEN GG SEEPSKQNL P EGVLQVNPV KQPPEASRNG
361 EAANLVDTG NDDSTMRSI NQIASKINNN EMPSPNLAMG NTGINNMD DRNSNLNSMG
421 IYNCHNSMN PHRGESLSRS SKFSGLSRSAT PSNCYGPEGS YKDVNHNMP NNIYGNSHRS
481 NLRNDSSEN PFEYNEN NRYDSYSTNE PPESHESFES NGYEEEDYHN RGRSQYNNS
541 RGYDFHNK
    
```

Center position: 4 Window size: Threshold:



Average: 0.984 Minimum: 0.823 Maximum: 1.136

Predicted peptides:

No.	Start	End	Peptide	Length
1	10	16	WGPCSNQ	7
2	19	26	TRTCLTNT	8
3	34	39	CSQCKE	6
4	53	70	RHIINCPFIIETQDCITD	18
5	73	85	GEIVYKKNRVIFD	13
6	103	111	IKPHFLQSQ	9
7	114	124	SQPVLIQASEQ	11
8	133	141	GTVSVSTPS	9
9	153	187	SSNVAASSQSVGSSQSVASSQAVDSSQGVSVQVGKG	35
10	211	217	KSPIAPA	7
11	273	300	SGTVASEAVASETVASGTVASGEVVAKE	28
12	332	347	PEGLVQVNPVVKQPPE	16
13	372	377	INQIAS	6
14	411	417	IYNCHNS	7
15	433	439	FSGLRSA	7
16	441	448	PSNCYGPE	8