

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

Caracterização da resposta imune celular induzida pela
imunização experimental com antígenos recombinantes de
Plasmodium vivax

Patricia Ostermayer Athayde Casale

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2013

Patricia Ostermayer Athayde Casale

Caracterização da resposta imune celular induzida pela
imunização experimental com antígenos recombinantes de
Plasmodium vivax

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora:
Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2013

Patricia Ostermayer Athayde Casale

Caracterização da resposta imune celular induzida pela imunização experimental com antígenos recombinantes de *Plasmodium vivax*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Irene da Silva Soares
Orientador/presidente

1º Examinador

2º examinador

São Paulo, _____ de 2013.

Trabalho realizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro concedido pela FAPESP, INCTV, CNPq e PRONEX-Rede malária.

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria e o homem que adquire conhecimento”.

Provérbios 3:1

Dedicatória

Aos meus pais, Orlando e Isaura Casale, meus exemplos de fé e perseverança. Agradeço pelo amor incondicional, pelas lições de vida e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu esposo Rodrigo Vallado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pela misericórdia e pela força para continuar.

À Professora Dra. Irene da Silva Soares, pela oportunidade de ingresso no laboratório de parasitologia e pela orientação.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Professora Dra. Daniela S. Rosa e sua aluna de mestrado Juliana Apostólito da Universidade Federal de São Paulo e à Professora Dra. Silvia B. Boscardin do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelo apoio concedido na padronização do Ensaio de proliferação celular com CFSE.

Ao professor Dr. Maurício M. Rodrigues do Centro de Terapia Celular e Molecular da Universidade Federal de São Paulo pela oportunidade de realização do ensaio de ELISPOT e ao seu aluno Jonatan Ersching pelo treinamento concedido.

Ao grupo da Professora Joseli O. Ferreira da Fundação Oswaldo Cruz pela síntese dos peptídeos de AMA1 utilizados neste trabalho.

À comissão organizadora do V Simpósio da Pós-graduação em Análises Clínicas pela oportunidade de apresentação oral do meu trabalho.

Agradeço em especial à técnica do Laboratório de Parasitologia, Kátia Sanches Françoso pela amizade, dedicação, apoio, atenção e principalmente por todas as orientações durante o período de realização do curso.

À Elaine C. Vicentin pelo apoio, amizade, aconselhamento e treinamento. Muito obrigada pela dedicação!

À minha querida amiga Mayne O. Pereira pelo acolhimento, companheirismo, amizade, pelo treinamento e por sempre estar disponível à ensinar. Obrigada pelo seu exemplo de caráter e profissionalismo.

À Luciana Lima pela amizade, apoio e disponibilidade em ajudar. Sou muito grata à você, Lu!

À Renata Albuquerque, pelo apoio e dedicação nos ensaios de citometria de fluxo. Agradeço muito por todas as discussões científicas, por todas os ensinamentos e pela amizade.

Às alunas de Iniciação Científica Mariana V. Rocha e Camila D. Romano, pela amizade, companheirismo e por todo o apoio e incentivo. Muito obrigada!

Ao Prof. Sandro Almeida do laboratório de Micologia, pela disponibilidade de seus equipamentos e aos seus alunos, Fabio Seiti, José Roberto, Grasielle Januzzi pelo apoio.

Às secretarias do Departamento de Análises Clínicas, Ana Dantas, Sueli Providelo e Edna Batista pelo excelente trabalho e pelo grande apoio.

Aos meus pais, pelo amor inigualável e por me apoiarem nos momentos mais difíceis, incentivando-me a continuar, o que tornou possível a realização deste sonho. Sem vocês, eu não teria chegado a lugar algum.

Ao meu amado esposo Rodrigo, obrigada por todo amor e carinho durante estes anos e por ter sido o primeiro a me incentivar a fazer o mestrado.

À tia Dilma Frazão, por ter aberto as portas da sua casa durante todo o período em que estive em São Paulo. Obrigada pelo carinho e compreensão que me sustentaram e me ajudaram nesta jornada.

À minha sogra Rose Andrade por me estender a mão toda vez que precisei de ajuda. Obrigada pelas palavras confortantes e incentivadoras.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
1. Introdução	1
1.1. Aspectos Epidemiológicos da Malária	2
1.2. Considerações sobre o <i>Plasmodium spp.</i>	5
1.3. Estratégias de controle da malária: ênfase no desenvolvimento de vacinas...	10
1.4. Resposta imune adquirida contra a malária	14
1.5. Antígenos de formas sanguíneas selecionados para o presente estudo.	17
1.5.1. AMA1.....	17
1.5.2. MSP1 ₁₉	21
1.5.3. MSP3.....	24
1.6. Efeito dos adjuvantes na vacinação contra malária	26
1.6.1. Adjuvante Incompleto de Freund.....	26
1.6.2. Quil A.....	27
1.6.3. Poly (I:C)	28
1.7. Estratégias combinadas de imunização contra a malária.....	29
2. Objetivos	31
2.1. Objetivo Geral	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. Material e Métodos.....	33
3.1. Obtenção das Proteínas Recombinantes	34
3.1.1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes MSP1 ₁₉ , MSP1 ₁₉ - PADRE e MSP3 β	34
3.1.2. Expressão e purificação da proteína recombinante AMA1	36
3.1.3. Obtenção da Proteína de fusão AMA1-MSP1 ₁₉	37

3.2. Peptídeos sintéticos	38
3.3. Imunizações Experimentais e Coleta de Sangue	39
3.4. Ensaio imunoenzimático.....	41
3.5. Análise da resposta celular	42
3.5.1. Retirada dos baços e obtenção de células esplênicas	42
3.5.2. Ensaio de proliferação celular com CFSE	43
3.5.3. Ajuste das voltagens do citômetro de fluxo	44
3.5.4. Análise dos eventos adquiridos na citometria de fluxo	45
3.5.5. Detecção de IFN- γ por ELISA de captura.....	46
3.5.6. ELISPOT para IFN- γ	47
3.6. Análise estatística	49
4. Resultados	50
4.1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes	51
4.2. Efeito da imunização de camundongos C57BL/6 com as proteínas recombinantes AMA1, MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3 β co-administradas na presença do Adjuvante Incompleto de Freund (AIF).....	52
4.3. Avaliação da resposta celular de camundongos BALB/c imunizados com a proteína AMA1, na presença de AIF: uso de peptídeos sintéticos como estímulo. 55	
4.4. Avaliação da resposta proliferativa induzida pela imunização com a proteína MSP1 ₁₉ -PADRE na presença de Quil A ou Poly (I:C).	58
4.5. Efeito da imunização de camundongos C57BL/6 com as proteínas AMA1, MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3 β co-administradas na presença do adjuvante Poly (I:C).	59
4.6. Efeito comparativo da imunização de camundongos C57BL/6 e BALB/c com a proteína de fusão AMA1-MSP1 ₁₉ emulsificada no adjuvante Poly (I:C).	64
5. Discussão.....	69
6. Conclusões.....	82
7. Bibliografia.....	84
8. Anexos	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da Malária no Brasil (WHO, 2012).....	3
Figura 2: Casos de malária registrados na Amazônia Legal entre 1960 e 2009 de acordo com as espécies (Adaptado de Oliveira-Ferreira et al., 2010).....	4
Figura 3: Ciclo biológico do <i>Plasmodium vivax</i> (Adaptado de Mueller et al., 2009)	8
Figura 4: Desenho esquemático da estrutura da proteína recombinante AMA1 de <i>Plasmodium sp.</i>	18
Figura 5: Representação esquemática da proteína MSP1 e as frações derivadas após clivagens.....	22
Figura 6: Desenho esquemático mostrando a proteína MSP3 β como proteína inteira utilizada neste trabalho.	26
Figura 7: Esquema de imunizações e sangrias.....	40
Figura 8: Estratégia de análise para avaliação da proliferação celular utilizando CFSE. Dot plot gerados através da análise no software Flowjo.	46
Figura 9: Análise da expressão e purificação das proteínas recombinantes AMA1, MSP3 β , MSP1 ₁₉ e MSP1 ₁₉ -PADRE em SDS-PAGE.....	51
Figura 10: Resposta proliferativa de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ marcadas com CFSE de animais imunizados com AMA1, MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3 β na presença de AIF.	53
Figura 11: Títulos de anticorpos IgG específicos de camundongos imunizados com AMA1, MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3 β na presença de AIF.....	54
Figura 12: Resposta proliferativa de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ marcadas com CFSE de camundongos imunizados com AMA1 na presença de AIF.	56
Figura 13: Detecção de IFN- γ por ELISA de captura no sobrenadante de cultura celular.....	57
Figura 14: Resposta proliferativa de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ marcadas com CFSE de camundongos imunizados com MSP1 ₁₉ -PADRE na presença de Quil A ou Poly (I:C).	59
Figura 15: Resposta proliferativa de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ marcadas com CFSE de camundongos imunizados com AMA1, MSP1 ₁₉ -PADRE e MSP3 β na presença de Poly (IC).	61

Figura 16: Detecção de IFN- γ por ELISPOT de células de baço de camundongos imunizados com AMA1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β na presença de Poly (I:C).....63

Figura 17: Detecção de IFN- γ por ELISPOT de células de baço de camundongos imunizados com AMA1-MSP1₁₉ na presença de Poly (IC)67

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
AMA1	Antígeno 1 de Membrana Apical
Amp	Ampicilina
AS01	Adjuvant System 01
BMGY	Buffered Glycerol Complex Medium
BMMY	Buffered Methanol Complex Medium
BSA	Albumina Sérica Bovina
-ME	-mercaptoetanol
Clora	Cloranfenicol
CD	Grupamento de diferenciação
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster
Con A	Concanavalina A
CSP	Proteína do circumsporozoíta
DAB	3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto
D.O.	Densidade óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBA	Erythrocyte binding Antigen
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ELISPOT	Enzyme-linked immunosorbent spot
EDTA	Ácido etilenotetracético
FSC	Forward Scatter

GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfônico
IE	Índice de Estimulação
IFA	Imunofluorescência indireta
Ig	Imunoglobulina
IL-2	Interleucina-2
IL-10	Interleucina-10
IFN- γ	Interferon-gama
IPA	Índice Parasitário Anual
IPTG	Isopropyl thio- β -D-galactoside
IRIV	Immunopotentiating reconstituted influenza virosomes
KDa	Quilo Dalton
L	Litro
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
μ g	micrograma
μ L	microlitro
mL	mililitro
MSP1	Proteína 1 da Superfície do Merozoíto
MSP2	Proteína 2 da Superfície do Merozoíto
MSP3	Proteína 3 da Superfície do Merozoíto
MSP6	Proteína 6 da Superfície do Merozoíto
MSP7	Proteína 7 da Superfície do Merozoíto

N	Normal
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	-Phenylenediamine
PADRE	Pan-allelic DR epitope
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Polimerase Chain Reaction
PIACM	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
RESA	Antígeno de Superfície do Eritrócito Infectado
RPM	Rotações por minuto
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute”
s.c	Subcutânea
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SEM	Erro Padrão da Média
SSC	Side Scatter
T.A	Temperatura Ambiente
TLR	Toll Like Receptor
TEMED	N,N,N',N' tetrametil etilenodiamida
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
Tris	Hidroximetilaminometano
x g	Força relativa de centrifugação
WHO	World Health Organization

RESUMO

CASALE, P.O.A. **Caracterização da resposta imune celular induzida pela imunização experimental com antígenos recombinantes de *Plasmodium vivax***. 2013. 118 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A malária continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública no mundo e apesar dos muitos esforços no combate a doença, as estratégias disponíveis hoje ainda não foram capazes de controlar com eficiência sua disseminação global. Por isso o desenvolvimento de uma vacina é de extrema importância. Devido a complexidade do ciclo do parasita, consideramos que uma formulação vacinal eficaz para a indução de resposta imune protetora contra o *P. vivax* deverá conter regiões de antígenos de vários estágios do parasita. Dentre os vários antígenos da fase sanguínea do plasmódio identificados, o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA1), a porção C-terminal da Proteína 1 de Superfície do Merozoíto (MSP1₁₉) e as proteínas da família MSP3 têm se mostrado promissores. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar a resposta imune celular induzida em camundongos pela imunização experimental com antígenos de *P. vivax* candidatos a vacina, tendo como foco principal a combinação das proteínas AMA1, MSP1₁₉ e MSP3 β . Inicialmente, as imunizações experimentais com a combinação dos 3 antígenos foram realizadas na presença de Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) em camundongos C57BL/6. Os camundongos imunizados não apresentaram respostas significativas com proliferação e secreção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ após estimulação *in vitro* com as proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos baseados na proteína AMA1. Por outro lado, o adjuvante Poly (I:C) mostrou-se mais eficiente na indução de resposta proliferativa por linfócitos T CD4⁺, quando testado com a proteína MSP1₁₉-PADRE. Assim, selecionamos este adjuvante para dar continuidade às imunizações experimentais com a combinação de antígenos. Por ELISPOT, foi possível demonstrar que a co-administração dos 3 antígenos foi capaz de estimular células produtoras de IFN- γ em resposta à todos os antígenos testados. Também foi nosso objetivo avaliar a produção de IFN- γ após imunização de linhagens distintas de camundongos com uma proteína quimérica recentemente produzida em nosso laboratório (AMA1-MSP1₁₉). Em C57BL/6, a produção de IFN- γ foi significativamente maior no grupo imunizado com a proteína de fusão, quando comparado com o grupo que recebeu a co-administração dos dois antígenos, mostrando que a utilização de proteínas fusionadas pode solucionar possíveis problemas de competição antigênica. Em conjunto, nossos dados demonstram que a utilização de múltiplos antígenos fusionados, ou co-administrados, pode ser uma estratégia promissora de vacinação contra a malária.

Palavras-chave: Parasitologia, malária, *P. vivax*, vacina, resposta imune celular.

ABSTRACT

CASALE, P.O.A. **Characterization of the cellular immune response induced by experimental immunization with recombinant antigens of *Plasmodium vivax***. 2013. 118 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Malaria remains as a major public health problem worldwide. In spite of the efforts for prevention, the strategies available today have not succeeded to control its global distribution. Therefore, the development of a vaccine is extremely important. Due to the complexity of the parasite cycle, we consider that an effective vaccine formulation to induce protective immune response against *P. vivax* should contain regions of antigens from several stages of the parasite. Among the different blood stage antigens of *Plasmodium* identified, the Apical Membrane Antigen 1 (AMA1), the C-terminal portion of the Merozoite Surface Protein 1 (MSP1₁₉) and MSP3 family proteins have shown promising results. Therefore, the aim of this study was to characterize the cellular immune response induced in mice by experimental immunization with antigens from *P. vivax* vaccine candidates, focusing mainly on the combination of proteins AMA1, MSP1₁₉ and MSP3 β . Initially, the experimental immunizations with the combination of the three antigens were performed in the presence of Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) in C57BL/6 mice. Immunized mice displayed no significant proliferative responses and secretion of IFN- γ by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes after *in vitro* stimulation with recombinant proteins or synthetic peptides based on the AMA1 protein. In contrast, Poly (I:C) adjuvant was more efficient inducing CD4⁺ T lymphocytes proliferative response to the MSP1₁₉-PADRE protein. Thus, we selected this adjuvant to continue the experimental immunizations with the different antigen combinations. The ELISPOT results demonstrated that co-administration of the 3 antigens stimulated IFN- γ producing cells in response to all antigens tested. We also assessed the production of IFN- γ after immunization of distinct mouse strains with a chimeric protein produced recently in our laboratory (AMA1-MSP1₁₉). In C57BL/6, IFN- γ production was significantly higher when we used spleen cells from mice immunized with the fusion protein, when compared with cells from mice that received the co-administration of two antigens, showing that the use of fused proteins can solve possible antigenic competition problems. Together, our data demonstrate that the use of multiple fused or co-administered antigens may be a promising strategy for malaria vaccination.

Keywords: Parasitology, malaria, *P. vivax*, vaccine, cellular immune response.

1. Introdução

1.1. Aspectos Epidemiológicos da Malária

A malária, doença infecciosa parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, continua sendo um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo. Apesar dos muitos esforços no combate a doença, as estratégias disponíveis não têm sido capazes de controlar com eficiência sua disseminação global (World Malaria Report, 2012). Existem em torno de 100 espécies de plasmódios causadores da malária. Contudo, são conhecidas apenas 5 que infectam o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, este antes infectante apenas para macacos. Nos últimos anos, casos de malária em humanos relacionados ao *P. knowlesi* nas Filipinas, Malásia e Tailândia, tornaram-se frequentes, classificando-o como a quinta espécie infectante também para o homem (White, 2007; Lee et al., 2009; Singh; Daneshvar, 2013).

Com relação à distribuição mundial, a doença concentra-se principalmente em regiões de clima tropical. Dentre as espécies de plasmódios que causam malária humana, o *P. falciparum* é considerado o mais virulento, com distribuição principalmente nos trópicos, sendo predominante no continente africano, enquanto que o *P. vivax* é considerado menos agressivo, porém com maior distribuição ao longo dos trópicos, subtropicais e regiões temperadas (revisado por Garcia, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 3,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão. Em 2011, foram registrados cerca de 87 milhões de casos de malária no mundo, onde a maioria, 79 milhões (90%) concentrou-se no continente africano. Em relação ao número de mortes, foram registradas em torno de 106.824, sendo a África responsável por 96% dos casos.

Crianças menores de 5 anos e mulheres grávidas são mais severamente afetadas pela doença (World Malaria Report, 2012).

O *P. vivax* é a segunda espécie mais prevalente no mundo. Além de coexistir em várias áreas com *P. falciparum*, concentra-se principalmente no leste e sudeste da Ásia, com 66% dos casos por esta espécie, seguida da região leste do mediterrâneo (15%) e da América do Sul (13%) (Arévalo-Herrera et al., 2010).

No Brasil, a Amazônia Legal, formada pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Rondônia, Roraima, Mato Grosso, Pará, Tocantins e uma parte do Maranhão, corresponde à região endêmica, concentrando 98,8% dos casos, como mostra a Figura 1.

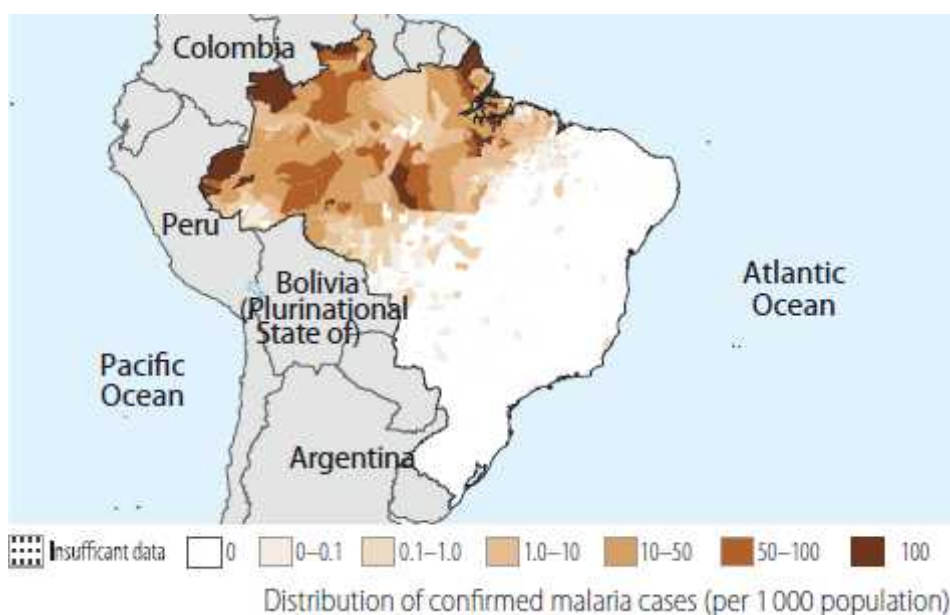


Figura 1: Distribuição da Malária no Brasil (WHO, 2012).

A espécie de maior distribuição no Brasil é o *P. vivax*, sendo responsável por 87% dos casos, seguido pelo *P. falciparum*, com 13% (World Malaria Report, 2012).

A figura 2 mostra o número de casos registrados de malária na Amazônia Brasileira (Amazônia legal) entre os anos de 1960 e 2009. Noventa municípios são

considerados de alto risco para a malária, ou seja, com um Índice Parasitário Anual (IPA) igual ou superior a 50 casos por 1.000 habitantes. A elevada taxa de transmissão está relacionada à vários fatores como a alta densidade de mosquitos vetores, agente etiológico e população suscetível, altos índices de pluviosidade, amplitude da malha hídrica e cobertura vegetal, assim como desmatamentos, construção de hidroelétricas, estradas e de sistemas de irrigação. Problemas sociais como a presença de numerosos grupos populacionais, morando em habitações com ausência completa ou parcial de paredes laterais e trabalhando próximo ou dentro das matas, também contribuem para a transmissão da malária (Ministério da saúde, 2009).

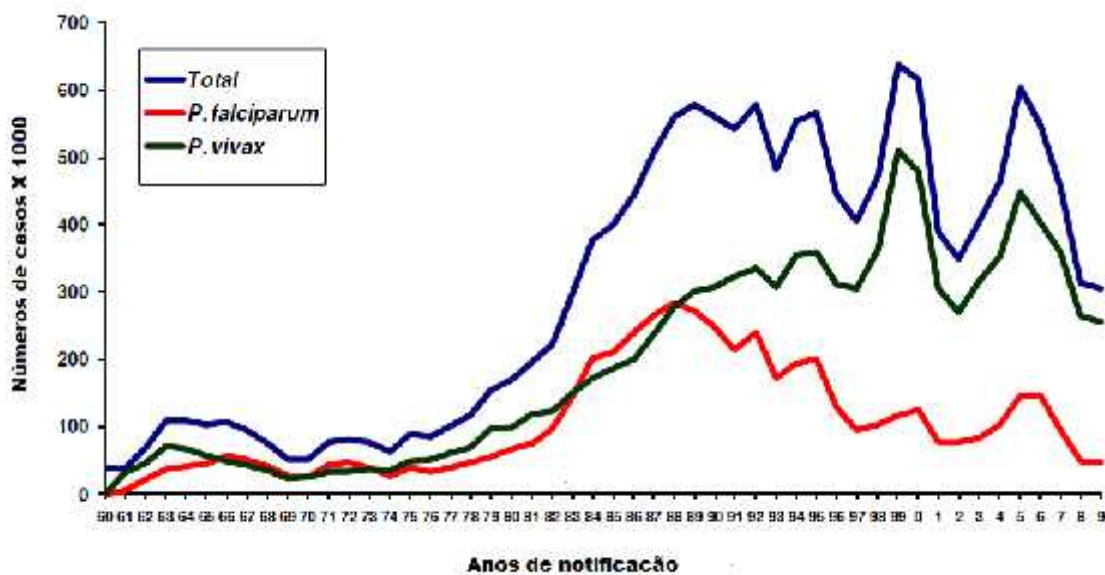


Figura 2: Casos de malária registrados na Amazônia Legal entre 1960 e 2009 de acordo com as espécies (Adaptado de Oliveira-Ferreira et al., 2010).

Nota-se que, por volta da década de 70 e 80 houve um grande aumento da incidência da doença atribuído a migração massiva e descontrolada para esta região incentivada pelos programas de colonização do governo. O maior índice de casos foi registrado em 1999, quando decidiu-se implementar o Plano de Intensificação das

Ações de Controle da Malária (PIACM) em áreas de alto risco, tendo como foco o diagnóstico precoce e tratamento dos casos (Oliveira-Ferreira et al., 2010).

No ano de 2009, foram registrados 306.908 casos da doença no Brasil (Ministério da Saúde, 2009). Em 2010, o número de casos subiu para 334.709, o que representa um aumento de 8% em relação ao ano anterior. Porém, dados publicados pelo Ministério da Saúde, mostram uma redução de 20% no número total de casos, 267.049, no ano de 2011 (<http://portal.saude.gov.br>). Desta forma pôde-se observar um declínio na incidência da malária no Brasil nos últimos anos, porém com valores ainda muito elevados sendo de extrema importância a intervenção utilizando novas estratégias mais eficazes, como por exemplo, uma vacina protetora proporcionando assim mais uma ferramenta na erradicação da doença (Hill, 2011).

1.2. Considerações sobre o *Plasmodium spp.*

O ciclo de vida dos plasmódios se desenvolve em dois hospedeiros: no homem (hospedeiro intermediário), com reprodução do tipo assexuada e no mosquito (hospedeiro definitivo), com reprodução sexuada. No hospedeiro intermediário o ciclo ocorre em duas fases: pré-eritrocítica, também chamada tissular primária ou hepática, que se processa no fígado e eritrocítica, desenvolvendo-se nos eritrócitos.

A infecção no homem acontece quando a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* introduz na derme, durante o repasto sanguíneo, os esporozoítos, formas infectantes do parasito, que estão presentes em suas glândulas salivares. Um estudo feito com *Plasmodium yoelii* demonstrou que estas formas podem permanecer viáveis no sítio de inoculação durante horas antes de chegar à corrente sanguínea (Yamauchi et al., 2007). Em *Plasmodium berghei*, foi demonstrado que

uma parte dos esporozoítos inoculados em camundongos penetra nos capilares sanguíneos enquanto outra nos vasos linfáticos chegando até os linfonodos (Amino et al., 2006). Guierard e colaboradores demonstraram recentemente, em um modelo murino de infecção também por *P. berghei*, que alguns esporozoítos permanecem na derme e se diferenciam em merozoítos (Gueirard et al., 2010). Uma vez no sangue periférico, o parasito circula por 30 a 60 minutos e então migra para o fígado. Neste órgão acontece o ciclo pré-eritrocítico ou hepático, onde os esporozoítos vão passar pela primeira divisão celular, processo chamado de esquizogonia, e se diferenciar em esquizontes, cada um produzindo em torno de 30.000 merozoítos, variando de acordo com a espécie (revisado por Doolan; Martinez-Alier, 2006).

Algumas características diferenciam as espécies de plasmódios entre si, como por exemplo, o *P. vivax* e *P. ovale* desenvolvem uma forma dormente nesta fase do ciclo, chamada hipnozoíto, responsável pelas futuras recidivas e de grande importância na sobrevivência do parasito em áreas com vetores sazonais (revisado por Hulden e Hulden, 2011). Esta fase do ciclo dura em média 14 dias correspondendo ao período de incubação da doença que no *P. vivax* pode variar de 8 a 17 dias (revisado por Garcia, 2010).

Os merozoítos formados são liberados do fígado e entram na circulação sanguínea através de vesículas denominadas merossomos, que se deslocam para os sinusóides hepáticos e depositam os merozoítos diretamente na circulação (Sturm et al., 2006). Os merozoítos invadem os eritrócitos e diferenciam-se em trofozoítos jovens, maduros e passam por um segundo processo de esquizogonia, onde cada esquizonte gerado irá romper-se e liberar novos merozoítos na corrente sanguínea que irão invadir outros eritrócitos. No caso do *P.*

vivax, as células alvo são hemácias jovens também conhecidas como reticulócitos, que representam cerca de 1% da população de hemácias, o que implica em parasitemias mais baixas em pacientes com malária por esta espécie (Mueller et al, 2009). Este momento coincide com o paroxismo malárico, que em geral se repete a cada 48 horas. O pico de parasitemia ocorre geralmente de 5 a 7 dias após o começo dos sintomas (revisado por Mueller et al., 2013). O processo de invasão dos eritrócitos, elemento chave durante o ciclo eritrocítico, é hoje um dos alvos da vacina contra a malária, pois impedindo o desencadeamento desta fase, a sintomatologia da doença não se manifestará ou será mais branda (revisado por Targett; Greenwood, 2008).

Após vários ciclos sanguíneos, alguns trofozoítos se diferenciam em formas sexuadas chamadas gametócitos por mecanismos ainda não esclarecidos e são ingeridos pelo mosquito durante a hematofagia. Começa então o ciclo no hospedeiro definitivo, conhecido como esporogônico. No estômago do mosquito, ocorre a fecundação onde o gameta masculino fertiliza o gameta feminino, gerando o zigoto, que por sua vez diferencia-se em oocineto móvel. Cerca de 24 horas depois, os oocinetos maduros atravessam primeiro a matriz peritrófica e, em seguida, o epitélio do intestino médio, dando origem ao oocisto. Após um período de maturação (aproximadamente 10 dias) o oocisto rompe-se e libera os esporozoítos na hemolinfa que iram reconhecer e invadir as glândulas salivares onde serão armazenados até a liberação durante a próxima hematofagia, capacitando o vetor para novas infecções (Figura 3).

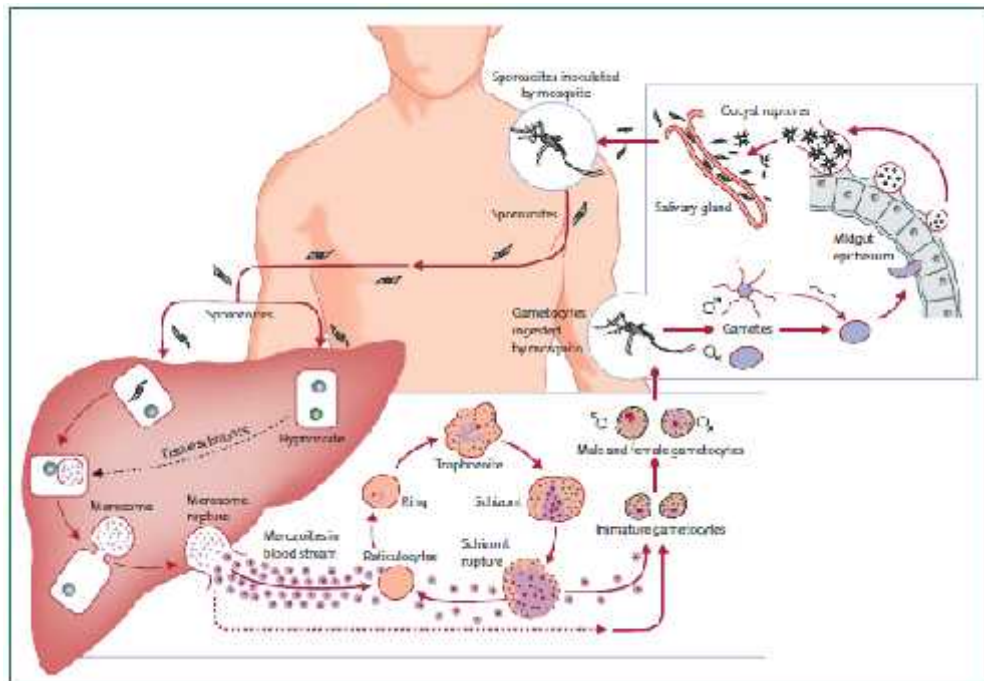


Figura 3: Ciclo biológico do *Plasmodium vivax* (Adaptado de Mueller et al., 2009)

Com relação às manifestações clínicas, a malária é uma doença aguda sistêmica, onde vários órgãos podem ser atingidos (Rey, 2008). A patogenia da doença é marcada inicialmente por mal-estar, cefaléia, indisposição e ligeira hipertermia. A febre então se acentua cada vez mais e dentro de alguns dias a maioria dos pacientes pode apresentar o típico paroxismo malárico caracterizado por calafrio, febre e sudorese. Sabe-se que toxinas pirogênicas liberadas pelo esquizonte durante sua ruptura, quando interagem com as células fagocíticas circulantes, são responsáveis pelo acesso febril no hospedeiro. Dentre estas, ganham destaque a molécula de ancoramento Glicosilfosfatilinositol (GPI) e o pigmento malárico ou hemozoína, resultante da digestão da hemoglobina pelo parasito (revisado por Oakley et al., 2011).

As formas mais graves da malária (insuficiência renal, edema pulmonar agudo, hemoglobinúria, malária cerebral, anemia grave e outros) geralmente

manifestam-se em indivíduos não residentes em áreas endêmicas (Doolan et al., 2009) e têm como agente etiológico o *P. falciparum*.

Anemia é consequência frequente em pacientes infectados por *P. vivax*. Porém, o impacto desta espécie na concentração da hemoglobina pode variar de insignificante a bastante grave, o que depende dos níveis de hemoglobina, antes da contração da doença (revisado por Douglas et al., 2012). Outra complicação observada em casos de malária por *P. vivax* é a insuficiência respiratória (revisado por Costa et al., 2012).

Ultimamente tornou-se bastante frequente o relato de casos complicados por *P. vivax* em várias partes do mundo, a maioria no sudeste da Ásia e na Índia. Sarkar e Bhattacharya relataram três ocorrências de malária cerebral por *P. vivax* em 2008 na Índia. Em 2009, seis casos de manifestações graves por *P. vivax* em crianças foram publicados, sendo que, dentre essas notificações, três eram de malária cerebral, duas de anemia severa e uma de alteração da função renal no mesmo país (Parakh et al., 2009). Na Colômbia, recentemente notificou-se um caso de um paciente que apresentou trombose do seio sagital em decorrência da malária cerebral por *P. vivax* (Pizón et al., 2013).

Em 2010, Alexandre e colaboradores descreveram uma série de casos de pacientes internados no período de 2001 a 2002 em Manaus com malária por *P. vivax* que tiveram complicações como icterícia e anemia grave. Este ano, um trabalho publicado por Raposo e colaboradores, relatou as principais manifestações clínicas em um grupo de pacientes com malária *vivax* no estado do Maranhão onde as principais complicações foram: distúrbios gastrointestinais (vômitos e diarreia), icterícia, distúrbios neurológicos (agitação, sonolência, confusão mental, perda da

consciência, convulsões), sangramentos e distúrbios respiratórios (Raposo et al., 2013).

Esses dados sugerem que a infecção por esta espécie pode não ser tão benigna quanto se pensava, necessitando de atenção e maiores pesquisas principalmente em alternativas para o controle da doença.

1.3. Estratégias de controle da malária: ênfase no desenvolvimento de vacinas

As estratégias atuais utilizadas no controle da malária giram em torno de duas grandes medidas: prevenção e gerenciamento dos casos, onde juntas, podem atuar na transmissão do parasito ao homem através do vetor e no desenvolvimento da doença, impedindo, principalmente, manifestações mais graves (World Malaria Report, 2012).

O controle do vetor tem um papel muito importante no combate à malária. Primeiramente, há necessidade de proteger o indivíduo contra a picada do mosquito, o que pode ser feito diminuindo a longevidade e densidade do vetor e o contato do homem com o mesmo, através de pulverizações com inseticidas dentro das residências e o uso de mosquiteiros também tratados com inseticidas, dessa maneira, a transmissão da malária em nível de comunidade é reduzida e conseqüentemente a incidência e prevalência da infecção em maiores proporções (WHO, 2011; White et al., 2011). No entanto o número de inseticidas recomendados para uso nestas metodologias é restrito (Pesticides and their application, WHO, 2006). Na última década, bilhões de dólares foram gastos na distribuição de redes e camas tratados com inseticidas, principalmente na África onde o número de mortes é maior, resultando em uma significativa redução dos casos de malária, porém ao

mesmo tempo, criou-se uma intensa seleção induzindo o desenvolvimento da resistência do vetor (revisado por Butler, 2011).

Outro aspecto importante no controle da doença é o diagnóstico confirmatório precoce, realizado principalmente pelo exame microscópico do sangue em esfregaço espesso, conhecido como gota espessa. Para isso, são necessários materiais e reagentes adequados e técnicos bem treinados, que possam detectar e diferenciar as espécies de plasmódios com eficácia (Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária, MS, 2009).

Além do diagnóstico, o tratamento precoce conduzido de maneira eficaz, reduz o curso da infecção e evita maiores complicações. No entanto a resistência às drogas antimaláricas tornou-se um dos maiores desafios no tratamento da infecção. A primaquina é a única droga em uso que atua de maneira eficaz contra o gametócito e a forma hepática latente, o hipnozoíto de *P. vivax* e *P. ovale*, porém seu uso é proibido em pacientes com deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) e em mulheres grávidas (Hobbs e Duffy, 2011).

Vacinas são as ferramentas de melhor custo benefício para a saúde pública (The malERA Consultative Group on Vaccines, 2011). Hoje, a maioria das vacinas disponíveis para uso em humanos pertence a três categorias: microrganismos vivos atenuados, microrganismos inativados e subunidades. Apesar de todos os esforços aplicados, não há vacina licenciada contra nenhuma doença parasitária humana, inclusive contra a malária. A dificuldade de desenvolver uma vacina altamente eficaz contra a malária levou a consideração de uma ampla gama de novas abordagens em vacinologia (revisado por Hill, 2011).

Uma das primeiras evidências de que o desenvolvimento de uma vacina contra o *Plasmodium sp.* é factível, foi demonstrada em meados dos anos 60. Nussenzweig e colaboradores verificaram que camundongos imunizados com esporozoítos irradiados de *P. berghei*, um plasmódio causador da malária em roedores, não desenvolviam a fase eritrocítica da doença quando desafiados contra o próprio parasito (Nussenzweig et al., 1967). Desde então, muitos investimentos estão sendo feitos na vacinologia contra a malária, inclusive no desenvolvimento de vacinas de subunidades. Isto inclui a síntese de peptídeos que tem sido muito útil no mapeamento de epítomos imunogênicos; vacinas de DNA, uma tecnologia de baixo custo, fácil produção e possibilidade de incorporar múltiplos genes em um modelo de vacina polivalente; a produção de proteínas recombinantes, incluindo proteínas quiméricas que conferem proteção tanto em modelos experimentais quanto em animais e no homem (revisado por Arévalo-Herrera e Herrera, 2001). A utilização de vírus recombinantes como o influenza, vírus da vaccinia e Adenovírus também tem se mostrado bastante promissora na indução da resposta humoral e celular contra antígenos específicos de diversos patógenos, como por exemplo HIV, vírus da raiva, *Plasmodium sp* e outros (revisado por Schuldt; Amalfitano, 2012). Além disso, a estratégia de vacinação utilizando protocolos de *prime-boost* heterólogo [dose(s) inicial(is) com uma estratégia de vacinação (DNA, proteínas recombinantes ou vetores virais), seguida(s) de uma ou mais doses de reforço com o antígeno sendo apresentado utilizando-se uma segunda estratégia de vacinação] também tem sido usada como uma forte ferramenta na indução da resposta imune protetora (revisado por Vasconcelos et al., 2012).

Infelizmente, não existe uma vacina licenciada contra o *Plasmodium sp.* RTS,S é uma formulação vacinal contra o *P. falciparum*, inicialmente desenvolvida por Walter R. Army, e posteriormente aperfeiçoada pela empresa britânica GlaxoSmithKline® (GSK), que se encontra em estudos clínicos de fase III na África. É composta por uma proteína quimérica recombinante expressa em *Saccharomyces cerevisiae* que é baseada na proteína do circosporozoíto (CSP) de *P. falciparum*, fusionada ao gene codificante da proteína S do vírus da hepatite B. Está emulsificada em um sistema adjuvante (AS01) composto por monofosforil lipídio A (MPL) e uma saponina denominada QS21, formando lipossomos. A RTS,S/AS01 tem demonstrado grande potencial em proteger crianças e adolescentes residentes em áreas endêmicas. Resultados parciais do estudo de fase III publicados recentemente, mostraram que esta vacina foi capaz de reduzir pela metade (50,4%) os episódios clínicos da doença inclusive manifestações graves em crianças com idade entre 5 e 17 meses no período de um ano após a vacinação (Agnandji et al., 2011).

Nos últimos 40 anos a maioria dos esforços na pesquisa e desenvolvimento de vacinas contra a malária tem sido focada no *P. falciparum*, por ser a espécie capaz de causar maior mortalidade (Galinski; Barnwell, 2008). Neste contexto, o *P. vivax* é negligenciado, já que por muito tempo foi considerado um parasito benigno. A falta de alguns recursos para o melhor entendimento da biologia desta espécie é algo que possivelmente contribui para a dificuldade no avanço das pesquisas com *P. vivax*. Ainda não foi estabelecido um modelo viável de cultura *in vitro* para este parasito, diferentemente do que já está bastante desenvolvido em *P. falciparum*, apesar dos mais de 100 anos de pesquisa (revisado por Noulin et al., 2013). Apesar

disto, muitos esforços estão sendo feitos na tentativa de preencher esta lacuna. Por exemplo, Russell e colaboradores padronizaram um protocolo de ensaio de re-invasão *ex vivo* para *P. vivax* com boa reprodutibilidade (Russell et al., 2011). A dificuldade de ensaios de cultivo desta espécie *in vitro* e outras limitações técnicas faz com que o apoio financeiro a pesquisas no desenvolvimento de medicamentos e principalmente de vacinas seja mais escasso. Porém, com os vários relatos de casos relacionados a este último de complicações graves, resistência a medicamentos e aos inseticidas disponíveis, a sociedade científica hoje começa a considerar que talvez o *P. vivax* não seja tão benigno quanto se pensava (revisado por Carlton et al., 2011).

1.4. Resposta imune adquirida contra a malária

A resposta imune adaptativa contra o parasito da malária, apesar de pouco compreendida, é importantíssima, não só para a prevalência e incidência da doença quanto para o desenvolvimento das manifestações clínicas no hospedeiro. A qualidade e longevidade desta resposta adquirida são altamente variáveis. Desde o início do século XX, já se observava que alguns indivíduos são capazes de desenvolver uma resposta protetora de longa duração mesmo com um número menor de eventos da doença, enquanto outros necessitam de repetidas exposições ou até mesmo exposições contínuas para desenvolver uma resposta protetora ao patógeno. Alguns fatores colaboram para essa diversidade de resposta como condições imunológicas do hospedeiro, idade, tipo de exposição prévia, espécie do parasita, e intensidade de transmissão (revisado por Mueller et al., 2013).

Sabe-se também que crianças mais velhas e adultos residentes em áreas endêmicas são menos propensos a desenvolver as formas graves da malária

quando comparadas com crianças mais jovens, o que sugere a capacidade desses indivíduos para desenvolver uma imunidade naturalmente adquirida, porém não estéril, contra a doença (revisado por Hafalla et al., 2011).

Outra característica importante é a especificidade da resposta imunológica contra a malária. A imunidade adquirida contra a doença é espécie-específica, ou seja, uma infecção natural causada por *P. vivax*, não desenvolve resposta protetora contra *P. falciparum*, por exemplo, (revisado por Mueller et al., 2013). Além disso, muitos trabalhos mostram que a resposta imune também é cepa-específica, podendo haver uma proteção cruzada entre cepas heterólogas, porém bastante superficial (Collins et al., 2004; Cheesman et al., 2006; Culleton et al., 2011).

Aparentemente, a imunidade contra o *P. vivax* é adquirida mais rapidamente do que quando comparada com a resposta desenvolvida contra o *P. falciparum*. Em um estudo desenvolvido durante 6 meses em crianças da Papua Nova Guiné, em tratamento para reinfecção foi observado que os novos episódios de malária por *P. falciparum*, confirmados por PCR, foram 21 vezes maiores do que por *P. vivax* (Michon et al., 2007). Em outro trabalho, realizado no mesmo país, crianças entre 1 e 4 anos de idade foram acompanhadas quanto ao número de infecções e sintomas de malária durante 16 meses através do monitoramento por microscopia e PCR a cada 8 semanas. Foi observado um número maior de episódios clínicos por *P. falciparum* do que por *P. vivax* com o aumento da idade (Lin et al., 2010)

Em decorrência do complexo ciclo de vida do parasita com desenvolvimento intracelular e extracelular, o sistema imune precisa mobilizar tanto a resposta humoral quanto a celular no combate à infecção (revisado por Tsuji, 2009). Durante a fase pré-eritrocítica, os anticorpos monoclonais específicos podem diminuir a

motilidade dos esporozoítos inibindo assim a invasão dos hepatócitos ou o crescimento do parasita dentro dos mesmos. Células T CD8⁺ (CTL) são indicadas como as principais células efetoras contra esta fase da doença, possuindo um papel crítico na destruição direta do hepatócito infectado juntamente com o IFN- γ , principal molécula efetora e via perforinas e granzimas. Células T CD4⁺ também são necessárias, pois auxiliam na ativação e diferenciação de células B ou de CTL (revisado por Doolan; Martinez-Alier, 2006).

A fase eritrocítica da malária é a única responsável pela sintomatologia da doença. Uma vacina contra as formas sanguíneas do parasito apresenta várias vantagens que devem ser consideradas, como a redução da morbidade e até da mortalidade e possível redução ou bloqueio da transmissão da doença através da diminuição da parasitemia (revisado por Finney et al., 2010).

Sabe-se que anticorpos desenvolvem um papel fundamental na resposta imune adquirida contra as formas do estágio sanguíneo em modelos experimentais, atuando diretamente no bloqueio da invasão dos eritrócitos pelos merozoítos. Além disso, para uma resposta eficaz é necessária a ativação de células T CD4⁺ com perfil Th1, mediada pela citocina IFN- γ capaz de ativar macrófagos que fagocitam eritrócitos infectados e merozoítos livres, impedindo o crescimento do parasita (revisado por Stevenson e Riley, 2004).

Vários estudos experimentais em animais e em humanos levaram ao consenso de que a habilidade do hospedeiro de regular a magnitude e o tempo da resposta inflamatória ao parasito também é importante contra a infecção, através da produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ e IL-2 regulatórias como IL-10 em níveis apropriados (revisado por Finney et al., 2010).

Dentre os vários antígenos da fase sanguínea do plasmódio estudados hoje, o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA1), a porção C-terminal da Proteína 1 de Superfície do Merozoíto (MSP1₁₉) e as proteínas da família MSP3 ganham destaque especial, sendo o foco deste trabalho.

1.5. Antígenos de formas sanguíneas selecionados para o presente estudo.

1.5.1. AMA1

O Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA1) é um membro da família das moléculas expressas e estocadas em organelas do polo apical conhecidas como micronemas sendo transportada para a superfície do parasito durante a invasão da célula hospedeira (Healer et al., 2002). Está presente em todas as espécies de *Plasmodium sp* e outras do filo *Apicomplexa*, como *Toxoplasma* e *Babesia* (Pizarro et al., 2005). Quanto à sua função, desempenha um papel ainda não totalmente esclarecido, porém relacionado à reorientação apical do parasito após a adesão inicial na célula a ser infectada (Mitchell et al., 2004).

Há alguns anos demonstrou-se que esta proteína, além de ser expressa em merozoítos da fase sanguínea assexuada também é expressa em esporozoítos, estando envolvida na reorientação destes durante a invasão dos hepatócitos, sendo perdida após este evento e voltando a ser expressa em merozoítos resultantes da esquizogonia hepática (Silvie et al, 2004). Seu tamanho varia de 556 a 563 aminoácidos na maioria das espécies de plasmódio (Figura 4). Essa molécula é sintetizada na forma de um precursor de 83 kDa que após clivagens origina um fragmento de 66 kDa e posteriormente duas frações, 48 kDa e 44 kDa. Possui 16

resíduos de cisteína, incorporados em 8 pontes dissulfeto formando em sua estrutura um ectodomínio composto por três regiões importantes conhecidas como domínio I, II e III (revisado por Remarque et al., 2007).

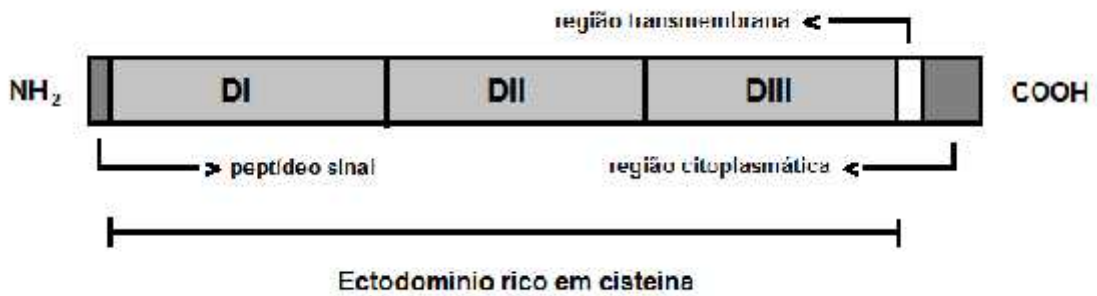


Figura 4: Desenho esquemático da estrutura da proteína recombinante AMA1 de *Plasmodium* sp.

AMA1 é um dos antígenos de *P. vivax* mais estudados como candidato à vacina para malária. Em 1999, macacos da espécie *Macaca mullata* foram imunizados com uma proteína recombinante baseada em PvAMA1 produzida em *Pichia pastoris*, utilizando como adjuvante o SBAS2 (MPL e QS21, em uma emulsão de óleo em água). Esta formulação demonstrou-se altamente imunogênica, induzindo a produção de IgG específicos contra a proteína, proliferação de células T e diminuição da parasitemia após desafio com *Plasmodium cynomolgi*. Em 2005, Rodrigues e colaboradores avaliaram a resposta de anticorpos contra PvAMA1 em indivíduos naturalmente expostos à malária. Foi demonstrado que anticorpos IgG dos soros de indivíduos infectados por *P. vivax* reconheceram tanto a proteína recombinante de PvAMA1 expressa em *P. pastoris*, utilizada no estudo anterior (81,5%) quanto em *Escherichia coli* (85%). Além disso, foi observado que houve um aumento da resposta de acordo com o número de infecções, chegando a 100% dos indivíduos com mais de três episódios de malária, o que também foi comprovado em

outro estudo realizado em 2006, onde se verificou que os níveis de anticorpos contra AMA1 de *P. vivax* em indivíduos residentes em áreas de baixa e moderada transmissão no Brasil, estão relacionados com a intensidade da exposição à malária (Morais et al., 2006).

Um estudo desenvolvido em nosso laboratório produziu proteínas recombinantes baseadas em cada domínio de AMA1 (domínios I, II e III) expressas em *E. coli* separadamente ou em combinação. Os resultados demonstraram que houve um maior reconhecimento das proteínas recombinantes contendo o domínio II pelos soros de indivíduos infectados com *P. vivax* quando comparado com os outros domínios, apresentando níveis similares ao ectodomínio (Múfalo et al., 2008). Posteriormente, Gentil e colaboradores observaram que uma vacina recombinante baseada no domínio II de PvAMA1 expressa em *E. coli*, é altamente imunogênica em camundongos quando administrada na presença de diversos adjuvantes, além de que anticorpos específicos contra este mesmo domínio reconheceram a proteína nativa expressa em merozoítos de *P. vivax* isolados de pacientes infectados (Gentil et al., 2010).

Vários estudos pré-clínicos utilizando proteínas recombinantes baseadas na AMA1 de outras espécies de *Plasmodium* evidenciam o potencial imunogênico deste antígeno. Anders e colaboradores demonstraram que, camundongos imunizados com a proteína recombinante baseada na AMA1 de *P. chabaudi* na presença do adjuvante Montanide ISA 720, desenvolveram proteção contra a infecção pelo parasita (Anders et al., 1998). Imunizações experimentais em coelhos com AMA1 recombinante de *P. falciparum* também emulsificada em Montanide ISA 720, foram capazes de induzir a produção de anticorpos que impediram a invasão *in vitro* de

merozoítos (Hodder et al., 2001). Um estudo em macacos da espécie *Aotus nancymae* avaliou uma vacina baseada na proteína AMA1 de *P. falciparum* cepa 3D7, emulsificada em dois sistemas adjuvantes: AS02 e Montanide ISA 720. Metade dos animais imunizados com a proteína, na presença do Montanide ISA 720 não desenvolveu infecção quando desafiados com FCH/4 (cepa heteróloga de *P. falciparum* infectante em macacos). Isto demonstrou que os altos títulos de anticorpos induzidos pela imunização promoveram proteção contra o desafio com cepas heterólogas de *P. falciparum* (Dutta et al., 2009).

Biswas e colaboradores desenvolveram uma vacina de vetor viral expressando AMA1 de *P. chabaudi chabaudi*, utilizada em um protocolo heterólogo de imunização, onde o *prime* foi feito com adenovírus e o *boost* com vírus modificado da vaccinia. Os resultados mostraram que a vacina é capaz de induzir resposta imune humoral e celular, além de desempenhar um papel protetor em camundongos imunizados quando desafiados com a cepa não letal de *P. chabaudi chabaudi*, atuando diretamente na redução do pico de parasitemia (Biswas et al., 2012).

Estudos clínicos de fase 1 em crianças e adultos residentes em Bandiagara, cidade rural no centro de Mali, África, foram feitos utilizando o candidato à vacina FMP2.1/AS02A que é baseado na proteína AMA1 da cepa 3D7 de *P. falciparum* emulsificada no sistema adjuvante AS02A. Os resultados demonstraram que o soro dos indivíduos adultos imunizados com a vacina foi capaz de impedir o crescimento *in vitro* de cepas homólogas de *P. falciparum* (Thera et al., 2008). Além disso, a vacina foi capaz de estimular a proliferação de células T em resposta ao re-estímulo

com PfAMA1 (Lyke et al., 2009) e induzir altos títulos de anticorpos específicos contra a proteína em crianças (Thera et al., 2010).

Recentemente foi gerada por nosso grupo uma nova proteína recombinante baseada no ectodomínio de AMA1 de *P. vivax*, utilizando um sistema de expressão em leveduras metilotróficas da espécie *P. pastoris*. Os resultados mostraram que esta proteína é capaz de induzir altos títulos de anticorpos e proliferação de células T em camundongos através de imunizações experimentais quando administrada na presença do adjuvante de Freund e da saponina Quil A. Além disso, também mostrou-se altamente imunogênica em infecções naturais, com nível de reconhecimento por anticorpos IgG de pacientes infectados com *P. vivax*, semelhante aos níveis da proteína PvAMA1 produzida em *E. coli* (Vicentin, 2012).

1.5.2. MSP1₁₉

Um dos antígenos de plasmódios mais estudados representa uma pequena fração (C-terminal, 19 kDa) da Proteína 1 de Superfície do Merozoíto (MSP1) e está envolvido na ligação do merozoíto à superfície do eritrócito. A MSP1 é sintetizada durante a esquizogonia (Holder; Freeman, 1982), juntamente com outras proteínas da mesma família (MSP6 e MSP7) na superfície do esquizonte em desenvolvimento, ancorada pela molécula GPI. Após a liberação dos merozoítos, a MSP1 sofre o primeiro processo de clivagem (processamento primário), mediado pela protease SUB1, resultando em polipeptídeos de vários pesos moleculares: MSP1₃₀, MSP1₃₈, MSP1₄₂ e MSP1₈₃ (Hodder et al., 1996). Quando o merozoíto invade o eritrócito, uma segunda clivagem ocorre na porção de 42 kDa resultando em 2 fragmentos, MSP1₃₃ (N-terminal) e MSP1₁₉ (C-terminal). O complexo MSP1, então, deixa a

célula, sendo liberado na circulação e apenas a porção C-terminal continua na superfície do merozoíto (Figura 5) (Blackman et al., 1990). MSP1₁₉ é composta basicamente de dois domínios de fator de crescimento epidermal (EGF) ricos em cisteína, que formam uma estrutura empacotada em forma de disco (Chitarra et al., 1999).

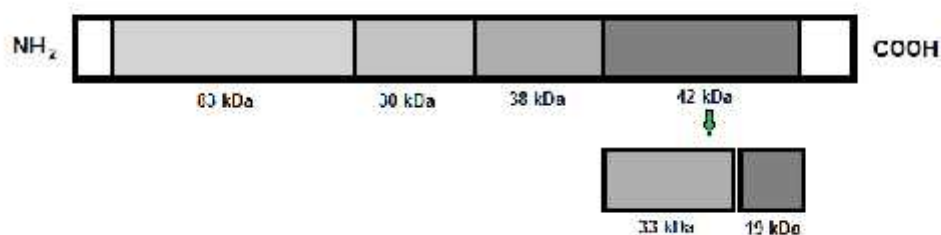


Figura 5: Representação esquemática da proteína MSP1 e as frações derivadas após clivagens.

Nosso grupo tem realizado vários trabalhos avaliando a antigenicidade e imunogenicidade da MSP1₁₉ de *P. vivax*. Em 1997, Soares e colaboradores avaliaram a antigenicidade de dez proteínas recombinantes baseadas em fragmentos da porção N-terminal de PvMSP1 e uma representando a porção C-terminal de PvMSP1 em indivíduos expostos à malária. Observou-se que, 47,2% dos indivíduos apresentaram índice de estimulação de proliferação celular considerável (IE>2) em resposta ao re-estímulo com MSP1₁₉ (Soares et al., 1997). Outro estudo mostrou que 93,5% dos pacientes infectado por *P. vivax* tinham anticorpos IgG contra proteínas recombinantes baseadas na MSP1₁₉ (Rodrigues et al., 2003).

Por estas razões, a MSP1₁₉ tem sido alvo de muitos estudos para proteção imune contra malária, tornando-se uma das moléculas de superfície mais estudadas do estágio eritrocítico do parasito nos últimos anos (Holder, 2009). Neste sentido, em um estudo onde o objetivo foi avaliar se a resposta imune induzida por MSP1₄₂,

tem participação da fração de 33 kDa da MSP1, notou-se que os altos títulos de anticorpos IgG induzidos em camundongos pela imunização com MSP1₃₃, semelhantes aos produzidos pela MSP1₄₂, não são capazes de promover proteção contra infecção quando os animais foram desafiados com uma cepa letal de *P. yoelii*, evidenciando que a MSP1₁₉ tem papel fundamental na resposta protetora induzida pela imunização com MSP1₄₂ (Ahlborg et al., 2002).

Em 2006, Rosa e colaboradores desenvolveram uma proteína recombinante baseada na MSP1₁₉ de *P. vivax* ligada à dois epítomos para células T helper (peptídeo interno da porção de 33 kDa da PvMSP1 e o peptídeo universal PADRE (Pan-allelic DR epitope). Os resultados demonstraram que esta proteína na presença do Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) foi capaz de gerar altos títulos de anticorpos em primatas não humanos da espécie *Callithrix jacchus jacchus*.

Bargieri e colaboradores avaliaram, em um modelo murino, as propriedades imunogênicas de uma formulação vacinal baseada em proteínas recombinantes derivadas da MSP1₁₉ de *P. vivax* (His₆MSP1₁₉ ou His₆MSP1₁₉-PADRE) emulsificadas em flagelina de *Salmonella typhimurium* FliC como adjuvante. Também se avaliou a proteína His₆MSP1₁₉-PADRE fusionada à flagelina (His₆FliC-MSP1₁₉-PADRE). Os resultados mostraram uma forte resposta de anticorpos IgG específicos contra MSP1₁₉ nos camundongos imunizados com a proteína tanto emulsificada quanto fusionada a flagelina FliC. Além disso, quando se adicionou o adjuvante CPG-ODN 1826 às formulações, houve uma maior produção de IFN- γ (Bargieri et al., 2008)

A fim de potencializar a resposta celular, selecionamos para este trabalho a proteína recombinante PvMSP1₁₉ ligada ao epítomo universal para células T CD4

(PADRE), cuja sequência é AKFVAAWTLKAAA. Este epítopo é capaz de se ligar a 15 das 16 moléculas de HLA humano mais comuns (Alexander et al., 1994). Estudos desenvolvidos por nossa equipe em camundongos mostram uma intensa estimulação de células T em resposta ao re-estímulo *in vitro* com a PvMSP1₁₉-PADRE através do ensaio proliferação celular por incorporação com 3H-Timidina, sem comprometer a resposta de anticorpos (Cunha et al., 2001, Rosa et al., 2004).

1.5.3. MSP3

A MSP3 de *P. vivax* (PvMSP3) é estruturalmente similar à MSP3 do *P. falciparum*. Elas contêm um domínio central rico em alanina (Figura 6) que parece formar uma estrutura secundária em α hélice e uma estrutura terciária *coil-coiled*. Essas proteínas não possuem uma região hidrofóbica que poderia ancorá-las na superfície do merozoíto e, por isto, acredita-se que possa ocorrer uma associação delas com outras proteínas ancoradas na superfície (Galinski et al., 1999; Galinski et al., 2001).

Nos últimos anos, geramos diversas proteínas recombinantes baseadas na MSP3: MSP3 α (C-terminal) e MSP3 (N e C-terminal, proteína inteira) (Jimenez et al., 2008). Estas proteínas foram utilizadas em estudos imunoepidemiológicos, os quais mostraram que a frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG durante a infecção patente contra pelo menos uma das proteínas recombinantes representando a MSP3 α e MSP3 β foi de 68,2% e 79,1%, respectivamente (Bitencourt et al., 2013). Estes estudos confirmaram dados prévios de que as MSP3 são imunogênicas em infecções naturais (Cunha, 2001).

Já foi demonstrado que a proteína MSP3 de *P. falciparum* expressa em *P. pastoris*, quando administrada em macacos da espécie *Aotus nancymai* foi capaz de promover proteção aos animais após desafio com *P. falciparum*. Após uma dose inicial juntamente com o Adjuvante Completo de Freund (ACF) e duas doses de reforço na presença de Montanide ISA51, observou-se que 5 dos 7 animais imunizados não desenvolveram a doença (Hisaeda et al., 2002).

Bang e colaboradores geraram oito proteínas recombinantes baseadas na combinação de várias regiões da família MSP3 de *P. falciparum*. Os resultados mostraram que todas as construções estimularam a produção de anticorpos IgG em camundongos, capazes de reconhecer epítomos da proteína nativa e também inibir o crescimento *in vitro* de *P. falciparum* (Bang et al., 2011)

Vários estudos clínicos com a proteína MSP3 de *P. falciparum* já foram conduzidos. Em 2009, Sirima e colaboradores, avaliaram a segurança e imunogenicidade de uma vacina baseada na porção C-terminal da proteína MSP3 emulsificada em hidróxido de alumínio administrada em crianças de Burkina Faso, África. Após 3 doses verificou-se a indução de altos títulos de anticorpos IgG específicos, com predominância das subclasses IgG1 e IgG3 detectados por ELISA (Sirima et al., 2009). Resultados semelhantes também foram observados com uma proposta vacinal também baseada na PMSP3 e hidróxido de alumínio em crianças da Tanzânia, África (Lusingu et al., 2009).

Dados recentes de nosso grupo mostraram que a MSP3 é altamente imunogênica na presença de diferentes adjuvantes, gerando altos títulos de anticorpos em camundongos quando administrada na presença de adjuvante incompleto de Freud (AIF), TiterMax e Quil A. Além disso, dados do mesmo trabalho

sugerem que esta proteína possui efeito intrínseco adjuvante quando administrada em camundongos na ausência de outros adjuvantes. Esse efeito foi independente da presença de LPS, pois a imunização de camundongos TLR4 *knockout* (não respondedores a LPS) mostrou resposta similar ao grupo de camundongos selvagens (Wild Type) (Bitencourt et al., 2013).



Figura 6: Desenho esquemático mostrando a proteína MSP3β como proteína inteira utilizada neste trabalho.

1.6. Efeito dos adjuvantes na vacinação contra malária

1.6.1. Adjuvante Incompleto de Freund

Considerado um adjuvante clássico, o AIF é uma solução aquosa que contém um óleo mineral e um agente emulsificador (geralmente Monoleato de Manide), que auxilia na dispersão das gotículas de óleo. Este composto é capaz de gerar uma intensa resposta imunológica, porém apresenta diversos efeitos indesejáveis, como dor no local da inoculação, formação de granuloma, sensibilidade e eritema. Existem algumas soluções baseadas no adjuvante Incompleto de Freund como por Montanide ISA 51, que difere do AIF por possuir o composto monoleato de manide de forma mais pura e também maior concentração do agente emulsificador (Miller et al., 2005; Vitoriano-Souza et al., 2012).

Rosa e colaboradores demonstraram, que a proteína MSP1₁₉ acoplada a dois peptídeos para células TCD4⁺, um peptídeo derivado da porção de 33 kDa da MSP1 e o peptídeo PADRE, foi capaz de gerar altos título de anticorpos em macacos quando administrada na presença de AIF (Rosa et al., 2006).

Um estudo clínico de fase 1 avaliou a segurança e imunogenicidade de uma formulação vacinal composta de 3 peptídeos sintéticos baseados na proteína CS de *P. vivax*, emulsificados em dois adjuvantes diferentes: Montanide ISA 51 ou Montanide ISA 720. Os resultados demonstraram que a ambas as formulações foram bem toleradas e apresentaram-se de maneira segura e sem efeitos adversos. Foram capazes de induzir anticorpos que reconheceram a proteína CS pelo ensaio de imunofluorescência, sendo que a vacina administrada na presença de Montanide ISA 51 apresentou maior reconhecimento e produção de IFN- γ (Herrera et al., 2011).

1.6.2. Quil A

Produto extraído da casca da árvore *Quillaja saponaria*. É uma saponina composta de uma mistura heterogênea de glicosídeos esteróides naturais que possuem diferentes ações biológicas e farmacológicas podendo atuar como imunomoduladores, anti-inflamatórios, anti-virais e outros. Atuam na membrana celular através da interação com o colesterol, formando poros que permitem a passagem do antígeno. Sua capacidade de estimular tanto a resposta TH1 quanto linfócitos T citotóxicos é extremamente importante para utilização em vacinas de subunidades (Sun et al., 2009). As saponinas possuem uma grande capacidade de estimular tanto o sistema imune humoral quanto celular de mamíferos, sendo bastante utilizada como adjuvante em vacinas pois já encontra-se liberado para uso

veterinário (Haçariz et al., 2009; Heath et al., 2012). Por se tratar de um composto bastante heterogêneo, quando analisado utilizando RP-HPLC, é possível observar várias frações com diferentes níveis de toxicidade e propriedades adjuvantes, como a QS-21, bastante utilizada em várias formulações vacinais, inclusive na RTS'S/AS01 (Xiang-Sun et al., 2009).

Resultados recentes obtidos por nossa equipe demonstraram que proteínas recombinantes baseadas nos antígenos AMA1 e MSP3 de *P. vivax*, quando administradas em camundongos na presença de Quil A, foram capazes de estimular títulos de anticorpos específicos, similares aos títulos induzidos pelas mesmas proteínas na presença de AIF (Vicentin, 2012; Bitencourt et al., 2013).

1.6.3. Poly (I:C)

Conhecido como Ácido Poliinosínico:policitidílico, do inglês *Polyinosinic:polycytidylic acid*, Poly (I:C) é um análogo sintético de RNA de cadeia dupla, semelhante ao que é expresso na membrana de células B, macrófagos e células dendríticas. Atua como potente ligante de TLR3, induzindo a ativação de células TCD4⁺ e a produção de IFN- γ e IL-2, podendo ser usado como um adjuvante para intensificar a resposta imune humoral e celular (Verdijik et al., 1999) em vacinas à base de proteínas. Encontra-se atualmente em estudos clínicos voltados principalmente para a imunoterapia do câncer (Okada et al., 2011, Sabatini et al., 2012).

Um estudo desenvolvido em primatas não humanos demonstrou que a proteína CS de *P. falciparum* administrada na presença de Poly (I:C) foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos IgG específicos nos soros destes animais, com

capacidade inibitória em ensaios *in vitro* de invasão de hepatócitos por esporozoítos de *P. falciparum*. Em adição a isso, observou-se também a estimulação de resposta de células T CD4⁺ produtoras de citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ (Tewari et al., 2010).

1.7. Estratégias combinadas de imunização contra a malária

Uma vacina de subunidades, apesar de se mostrar promissora, apresenta alguns desafios a serem ainda superados. Sabe-se que há uma grande dificuldade de gerar uma resposta expressiva contra um único antígeno recombinante, por isso a adição de adjuvantes em formulações vacinais é de extrema importância para a geração de uma resposta mais eficiente (Miyaji et al., 2011). Desta forma, é prudente considerar que uma vacina eficaz contra a malária deva conter epítomos imunodominantes de antígenos de vários estágios do parasito, sendo interessante a combinação de duas ou mais formas em uma mesma vacina.

Um estudo em camundongos, publicado em 2003, mostrou que formulações vacinais combinando *PcAMA1* e *PcMSP1₄₂* com diferentes adjuvantes induziram níveis elevados de proteção contra infecções por *P. chabaudi* comparados às imunizações com os antígenos isoladamente, sendo que a combinação das duas proteínas recombinantes na presença de sais de Alumínio (Alum), gerou níveis moderados de anticorpos IgG e mostrou-se bastante eficaz na diminuição da parasitemia em animais desafiados com o parasito (Burns et al., 2003).

Genton e colaboradores demonstraram em 2003 que uma vacina composta por três fragmentos recombinantes de *P. falciparum* derivados de fortes candidatos a vacina, antígeno de superfície do eritrócito infectado (RESA), proteína 1 de superfície do merozoíto (MSP1) e proteína 2 de superfície do merozoíto (MSP2),

reduziu em 62% a carga parasitária em crianças imunizadas na presença do adjuvante Montanide ISA 720.

Estudos pré-clínicos desenvolvidos em camundongos e coelhos por Oktisu e colaboradores, mostram que a combinação de UK39 e AMA49-C1, dois peptídeos sintéticos baseados nas repetições NANP da proteína CS e no “loop” 1 de ligação ao eritrócito do domínio III da proteína AMA1, respectivamente, em uma formulação virossomal utilizando IRIVs, não interfere na resposta imune contra nenhum desses componentes, o que é bastante positivo na utilização de uma vacina multivalente de subunidades (Oktisu, et al., 2008).

Atualmente na Índia, a vacina JAIVAC formada pela combinação de antígenos encontra-se em estudo clínico de fase 1a. É composta por duas proteínas recombinantes baseadas na MSP1₁₉ e EBA175, ambas produzidas em *E. coli*, emulsificada em Montanide ISA 720 (<http://clinicaltrials.gov>). Nos EUA, encontra-se em estudo clínico de fase Ib a vacina conhecida por BSAM-2/Alhydrogel + CPG, que é baseada na combinação de duas proteínas recombinantes de *P. falciparum*: AMA expressa em *P. pastoris* e MSP1₄₂ expressa em *E. coli*. A formulação contém hidróxido de alumínio e antes da vacinação é adicionado CPG 7909 (Ellis et al., 2012). Outra vacina também em estudo clínico de fase 1 é a GMZ2, composta pelas proteínas GLURP e MSP3 de *P. falciparum* (Mamo et al., 2013).

Por esta razão é nossa proposta que a co-administração de proteínas recombinantes baseadas nos antígenos de fase sanguínea de *P. vivax*, AMA1, MSP1₁₉ e MSP3 β , possa aumentar a eficiência da resposta imune protetora, sendo o foco principal a resposta imune celular contra o parasito em um modelo de imunizações experimentais em camundongos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

2.1.1. Analisar a resposta imune celular induzida em camundongos pela imunização experimental com antígenos recombinantes de *P. vivax*, tendo como foco principal a combinação de proteínas de superfície de merozoítos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Expressar e purificar as proteínas recombinantes MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE, MSP3 e AMA1 de *P. vivax*;

2.2.2. Imunizar camundongos com cada uma das três proteínas recombinantes MSP1₁₉-PADRE, MSP3 e AMA1 administradas individualmente, ou em combinação, na presença de adjuvantes;

2.2.3. Analisar a resposta celular de animais imunizados com cada uma das proteínas, em comparação com a resposta induzida pela co-administração das três proteínas. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

a) proliferação celular após marcação com CFSE e caracterização do fenótipo das células CD3 e CD4/CD8 por marcação de superfície utilizando citometria de fluxo;

b) detecção de IFN- γ por ELISA de captura e ELISPOT.

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção das Proteínas Recombinantes

Este projeto foi aprovado pelo Comitê Interno de Biossegurança em 15/03/2011 com número de ofício 0032011/FCF.

Para a obtenção dos antígenos recombinantes propostos neste trabalho, foram utilizados dois diferentes sistemas de expressão. As proteínas MSP1₁₉ (89aa) e MSP1₁₉-PADRE (representando o antígeno MSP1₁₉ acoplado ao epítipo universal de células T - Pan-allelic DR epitope) foram expressas em *Escherichia coli* da linhagem BL21 (DE3, Novagen) a partir do vetor pET-14b (Cunha et al., 2001). A proteína MSP3 β (620aa) também foi expressa a partir do vetor pET-14b, porém na linhagem Rosetta (DE3, Novagen)(Jimenez et al., 2008). Para a produção da proteína AMA1 (445aa), utilizamos o sistema de expressão secretada em leveduras da espécie metilotrófica *P. pastoris*, linhagem GS115 (Invitrogen), conforme padronizado recentemente pelo nosso grupo (Vicentin, 2012). Todos os procedimentos de expressão e purificação destas proteínas foram desenvolvidos de acordo com protocolos já estabelecidos em nosso laboratório nas publicações mencionadas.

3.1.1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β

Inicialmente, uma colônia de bactéria transformada contendo o plasmídeo correspondente à proteína MSP1₁₉ ou MSP1₁₉-PADRE foi inoculada em meio LB-amp (Luria Broth – Invitrogen, contendo 100 μ g/mL de ampicilina-Sigma). O mesmo procedimento foi realizado com a bactéria contendo o plasmídeo correspondente a MSP3 β , porém em meio LB-amp-clora (LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina e 35

$\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol-USB Corporation). A incubação foi realizada durante a noite, a 37°C , sob agitação constante a 200 rpm. Após 16 horas, o pré-inóculo foi diluído 50X em meio LB suplementado com os antibióticos específicos. A cultura foi incubada para crescimento por 2 horas, a 37°C , sob agitação constante a 200 rpm, até atingir DO_{600} entre 0,6 a 0,8. Após esse período, as bactérias foram induzidas a transcrição proteica com 0,1 mM de Isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG, Invitrogen), durante 4 horas. O produto da expressão foi centrifugado a $1600 \times g$, durante 15 minutos a 4°C . O precipitado contendo as células foi, então, ressuspendido em tampão de lise [57,5 mM NaH_2PO_4 (Synth), 128,7 mM NaCl (Synth), 1 mM PMSF (fluoreto de fenilmetilsufonila - Sigma) e 0,4 mg/mL de lisozima (Sigma)] para ser submetido ao processo de sonicação no equipamento Branson Digital Sonifier. Foram aplicados 6 ciclos de 1 minuto a 50% de amplitude, em banho de gelo, com intervalos de 1 minuto. Em seguida, o lisado de bactérias foi centrifugado a $15.000 \times g$ por 45 minutos a 4°C .

Para o processo de purificação, primeiramente foi adotada a cromatografia de afinidade em resina de níquel Sepharose™ High Performance (GE Healthcare). O sobrenadante obtido após a sonicação, foi aplicado lentamente na resina de níquel previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio (57,5 mM NaH_2PO_4 , 128,7 mM NaCl, e 1 mM PMSF; pH=7,0), seguido do tampão de lavagem [(57,5 mM NaH_2PO_4 , 128,7 mM NaCl, 10% glicerol (m/v) e 1 mM PMSF; pH=6,0)] e do gradiente de imidazol (USB Corporation) de 30 a 400 mM para a eluição da proteína. As alíquotas foram recolhidas e analisadas por SDS-PAGE e as frações contendo a proteína foram agrupadas e dialisadas contra solução A (20 mM Tris-HCl, pH=8,0) para purificação por cromatografia de troca iônica no equipamento AKTAprime PLUS (GE

Healthcare). A proteína foi aplicada na coluna Q FF (GE) acoplada ao sistema, previamente equilibrada com Solução A. A eluição foi feita por gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl, neste mesmo tampão.

Após nova análise por SDS-PAGE as alíquotas foram então dialisadas contra PBS (8 mM NaH₂PO₄, 2,3 mM Na₂HPO₄, 130 mM NaCl; pH 7,4) e foram quantificadas utilizando o método da curva padrão de BSA (Sigma), através da comparação entre diferentes alíquotas de proteína e concentrações conhecidas de albumina de soro bovino (BSA, Sigma) em gel de eletroforese. Após a quantificação, as proteínas foram devidamente identificadas e estocadas a -20°C.

3.1.2. Expressão e purificação da proteína recombinante AMA1

Um clone da levedura contendo o plasmídeo correspondente ao antígeno AMA1 foi incubado, sob agitação constante a 230 rpm, a 30°C, em meio BMGY [1% (m/v) extrato de levedura (Sigma), 2% (m/v) peptona (Sigma), 100 mM KH₂PO₄ (Synth), 0,34% (m/v) base nitrogenada de levedura (Invitrogen), 1% (m/v) sulfato de amônio (Sigma), 4x10⁻⁵% (m/v) biotina (Gibco) e 3% (m/v) glicerol (Sigma)], por 24 horas. Após o crescimento, as células foram recolhidas por centrifugação e transferidas para o meio de indução BMMY [1% (m/v) metanol, 1% (m/v) extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 100 mM KH₂PO₄, 0,34% (m/v) base nitrogenada de levedura, 1% (m/v) sulfato de amônio, 4x10⁻⁵% (m/v) biotina e 0,5% (v/v) metanol (Synth)]. O cultivo foi mantido sob agitação constante a 230 rpm, a 30°C, durante 72 horas, com adição diária de 1% de metanol, como única fonte de carbono. Passado esse período, o produto da expressão foi centrifugado durante 15 minutos, a 15.000 x g, 4°C. O sobrenadante contendo a proteína solubilizada foi concentrado 10X

utilizando um sistema de ultrafiltração com membrana de 30.000 NMWL (Millipore) sob condições de acordo com o fabricante e dialisado contra tampão de equilíbrio (20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄, 200 mM NaCl, pH=8,0), utilizando membranas de 10.000 MWCO (Thermo Scientific) para posterior purificação.

Após a expressão, o sobrenadante contendo a proteína AMA1 solubilizada foi dialisado contra o tampão de equilíbrio (20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄, 200 mM NaCl, pH=8,0) e aplicado na coluna contendo resina de níquel Sepharose™ High Performance (GE Healthcare) para a purificação por cromatografia de afinidade. Para este procedimento, a resina foi previamente equilibrada com o mesmo tampão. Em seguida, foi feita uma lavagem utilizando tampão de lavagem [20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄, 0,5 M NaCl, 10% glicerol (m/v) e 1 mM PMSF; pH=6,0] para aplicação do gradiente de imidazol (15 a 400 mM) neste mesmo tampão. Após passagem pela resina, as alíquotas foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 12%. A purificação por cromatografia de troca iônica e a quantificação, foram realizadas seguindo os mesmos protocolos utilizados para a obtenção das proteínas recombinantes produzidas em sistema de expressão bacteriano.

3.1.3. Obtenção da Proteína de fusão AMA1-MSP1₁₉

Recentemente, foi produzida em nosso laboratório uma proteína recombinante quimérica baseada na fusão de domínios imunodominantes dos antígenos AMA1 e MSP1₁₉. Primeiramente, o plasmídeo recombinante correspondente a AMA1-MSP1₁₉ foi sintetizado comercialmente pela companhia *Genscript* para a expressão em *P. pastoris*. O clone contendo o plasmídeo foi selecionado e cultivado por 24 horas, a 28°C, 230 rpm, em 200 mL de meio

contendo glicerol 1% (BMGY). Após este período, as células foram recolhidas por centrifugação e foram diluídas em 1 L de meio contendo 1% de metanol (BMMY) como única fonte de carbono. O cultivo foi mantido sob agitação constante a 230 rpm, a 28°C, durante 72 horas. Para a confirmação da expressão da proteína, o sobrenadante da cultura foi analisado por eletroforese em SDS-PAGE 12%. A proteína obtida no sobrenadante foi purificada por cromatografias de afinidade e de troca iônica, no equipamento AKTAprime PLUS (GE Healthcare). Este protocolo foi padronizado e executado pela aluna Mariana Vilela Rocha, como parte do seu projeto de iniciação científica (Rocha et al., 2012).

3.2. Peptídeos sintéticos

Nosso grupo investiu na identificação de epítomos baseados na proteína AMA1, com perfil de antigenicidade para MHC de classe II, através da análise *in silico*. A sequência da proteína AMA1 (Rodrigues et al., 2005) de 445 aminoácidos foi enviada ao grupo da Profa. Dra. Joseli O. Ferreira da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) para análise pelo banco de dados “Immuneepitope” (<http://www.immuneepitope.org/>), com o objetivo de identificar potenciais epítomos para células T CD4. Foi avaliado o perfil de antigenicidade para três alelos de MHC de classe II de camundongos BALB/c (H2-IAb, H2-IAAd, H2-IEd) e as regiões que obtiveram pelo menos 70% de score antigênico foram selecionadas. Dentre essas sequências potencialmente mais antigênicas, foram também determinadas as mais promíscuas, ou seja, que se ligam a mais de um alelo de HLA de classe II de populações brasileiras contempladas no artigo de Alves e colaboradores.

Os resultados indicaram as seguintes sequências de 15-mers mais promíscuas e mais antigênicas:

#31 (RVDLGEDAEVENAKY)

#217 (LWVDGNCEEIPYVKE)

#219 (VDGNCEEIPYVKEVE)

#247 (ASASDQPTQYEEEMT)

#248 (SASDQPTQYEEEMTD)

#249 (ASDQPTQYEEEMTDY)

#396 (RISNSTCNFYVCNCV)

#397 (ISNSTCNFYVCNCVE)

Após a predição, foram sintetizados quatro peptídeos de AMA1 possivelmente ligantes de MHC-II.

#31 (RVDLGEDAEVENAKY)

#217 #219 (LWVDGNCEEIPYVKEVE)

#247 #248 #249 (ASASDQPTQYEEEMTDY)

#396 #397 (RISNSTCNFYVCNCVE)

Os peptídeos acima foram avaliados quanto sua capacidade de indução da resposta imune celular através dos ensaios de proliferação celular com CFSE e ELISA de captura para IFN- γ no sobrenadante da cultura. Para isso, células esplênicas de camundongos imunizados com a proteína AMA1 foram estimuladas *in vitro* com 10 μ g/mL de cada peptídeo ou 20 μ g/mL do *pool*.

3.3. Imunizações Experimentais e Coleta de Sangue

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/FCF/313) em 07/04/2011.

Foram utilizados, neste trabalho, camundongos isogênicos, fêmeas, com idade entre 6 a 8 semanas, das linhagens C57BL/6 ou BALB/c de acordo com cada experimento, procedentes do biotério da FCF-IQ/USP. Os animais foram imunizados por via subcutânea (s.c.) e receberam a primeira dose de 100 μ L nas patas traseiras, sendo administrados 50 μ L em cada uma. As doses de reforço foram inoculadas com volume total na base da cauda, 15 dias após a última imunização, como mostra a figura 7.

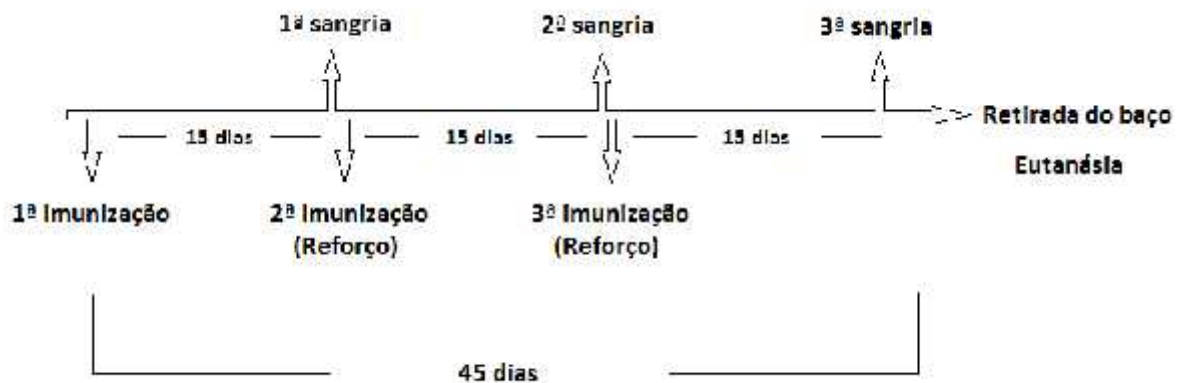


Figura 7: Esquema de imunizações e sangrias.

Com a finalidade de monitorar a eficácia das imunizações através da detecção de anticorpos específicos contra cada antígeno, foram realizadas coletas de sangue fazendo-se um pequeno corte na ponta da cauda de cada animal 14 dias após cada imunização. As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas e os soros aliqüotados para serem utilizados na detecção de anticorpos IgG específicos pelo método de ELISA. Ao final dos 45 dias de imunização, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e os baços retirados para a obtenção das células esplênicas.

Cada proteína recombinante foi inoculada na concentração previamente estabelecida pelo grupo (10 µg/dose), administrada em PBS estéril, na presença dos adjuvantes AIF (Sigma, 1:1), Quil A (Superfos Biosector, Vedbaek, Denmark, 25 µg/dose) ou Poly (I:C) (InvivoGen, 50 µg/dose).

3.4. Ensaio imunoenzimático

A determinação dos títulos de anticorpos IgG foi feita por ELISA conforme descrito previamente pelo nosso grupo (Múfalo et al., 2008; Gentil et al., 2010). Foram utilizadas placas de 96 poços do tipo “high binding” (3590, Costar), sensibilizadas com 2 µg/mL das proteínas recombinantes diluídas em tampão carbonato [(15 mM Na₂CO₃, 34,9 mM NaHCO₃ (Synth); pH=9,6] em um volume final de 50 µL de solução por poço, incubadas em temperatura ambiente, durante a noite. Após 3 lavagens com PBS-Tween [0,05% Tween 20 (USB Corporation), em PBS, pH=7,4] foram feitas, preparando as placas para a adição de 200 µL/poço de solução de bloqueio [5% (m/v) leite em pó desnatado (Molico®), 2,5% (m/v) albumina sérica bovina (BSA-Sigma) em PBS], durante 2 horas a 37°C. A solução foi então desprezada e 50 µL/poço de cada um dos soros dos camundongos, diluídos a partir de 1:100 em solução de bloqueio, foram adicionados. Posteriormente, outra incubação por 1 hora em temperatura ambiente foi feita e então as placas novamente foram lavadas com PBS-Tween. Foram adicionados 50 µL em cada poço do anticorpo secundário conjugado a peroxidase (IgG de cabra anti-IgG de camundongo, KPL) diluído 1:3.000. Outra incubação foi realizada por 1 hora em temperatura ambiente, seguida de 3 lavagens com PBS-Tween. A etapa de revelação foi feita pela adição de 100 µL/poço da solução de revelação [9,25 mM

OPD (Sigma); 0.1% (v/v) H₂O₂ (Merck)] em tampão fosfato-citrato [200 mM Na₂HPO₄ (Synth), 218 mM C₆H₈O₇ (Synth); pH=4.5-5.0] e a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 µl/poço de solução de parada (4N H₂SO₄).

Os títulos de anticorpos IgG específicos contra as proteínas recombinantes foram determinados em uma leitora de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA). Definimos os títulos específicos de anticorpos contra as proteínas recombinantes como a maior diluição com uma DO₄₉₂ superior a 0,1. Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos IgG em log₁₀ ± erro padrão da média.

3.5. Análise da resposta celular

3.5.1. Retirada dos baços e obtenção de células esplênicas

Todos os procedimentos de manipulação dos animais, eutanásia e retirada dos baços foram realizados no Biotério da FCF-IQ/USP.

Inicialmente, 3 animais de cada grupo foram selecionados e colocados na Câmara de CO₂. Após a confirmação da ausência de sinais vitais, os camundongos foram levados ao fluxo laminar para retirada dos baços. Os órgãos dos animais foram colocados juntos em um filtro de células de 70 µm (BD Falcon) embebido em meio RPMI [1,04% RPMI 1640 (Sigma), 0,24% HEPES (Gibco); 0,2% de NaHCO₃, 133 µg/mL estreptomicina (Sigma); 59 µg/mL penicilina (Sigma) em H₂O milliQ], para serem macerados e permitir assim a coleta das células esplênicas. Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, as células foram transferidas para tubos estéreis de 15 mL, devidamente identificados por grupo, e estocadas no gelo para serem transportadas ao laboratório.

O *pool* de células esplênicas obtidas dos camundongos foi centrifugado a 300 x g, 4°C, durante 5 minutos. Após isso, o sobrenadante foi decantado e acrescentados 1 mL/baço de tampão hemolítico (0,15 M NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2-7,4) para lise das hemácias, durante 2 minutos. Passado o tempo de ação do tampão, foi acrescentado meio RPMI para nova centrifugação sob as mesmas condições acima, visando à retirada do excesso de fragmentos celulares. Este procedimento foi realizado 2 vezes, e as células foram ressuspensas em 3 mL/baço de meio RPMI suplementado [meio RPMI com 0,055 mM 2-mercaptoetanol (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 1 mM Piruvato de Sódio (Gibco), 1% Vitaminas-MEM (Gibco), 1% Aminoácidos Não-Essenciais-MEM NEAA (Gibco) e 10% de soro bovino fetal (Gibco)], para a avaliação da viabilidade celular com o corante Azul de Trypan (Gibco), diluído 4X e quantificação das células mononucleares na câmara de Neubauer.

3.5.2. Ensaio de proliferação celular com CFSE

Após a obtenção e quantificação das células esplênicas dos camundongos imunizados, prosseguimos com o ensaio de proliferação celular a fim de caracterizar o fenótipo das células proliferativas. Para isso, utilizamos o marcador fluorescente CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl Ester, Invitrogen), de acordo com o protocolo descrito por Ribeiro e colaboradores em 2010, que permite tanto a identificação da progênie celular quanto a análise da divisão individual de células que tenham sido submetidas a vários ciclos celulares (Lyons e Parish, 1994).

As células esplênicas (5×10^7 /mL) foram incubadas em PBS estéril contendo 1,25 μ M de CFSE, durante 10 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Após este período,

foram feitas 3 lavagens com meio RPMI e as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado. Foi feita uma nova contagem em câmara de Neubauer e análise da viabilidade celular com Azul de trypan (diluído 4X). Para o cultivo, utilizou-se 3×10^5 /mL células em um volume final de 200 μ L em placas de 96 cavidades de fundo U (Costar, 3799). Os estímulos *in vitro* foram adicionados nas concentrações finais de 10 μ g/mL (para as proteínas recombinantes, peptídeos de AMA1 e o peptídeo PADRE) e 20 μ g/mL (quando pool de peptídeos de AMA1). Como controle positivo, utilizamos 2,5 μ g/mL do mitógeno Con A (Concanavalina A, Sigma), ou nenhum estímulo como controle negativo. Após o plaqueamento, a cultura de células foi mantida por 5 dias a 37°C, em atmosfera contendo 5% CO₂.

Passado o tempo de incubação, todo o conteúdo da cultura de células foi transferido para placas de fundo V e então centrifugado a 300 G, durante 6 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi decantado e as células foram ressuspensas em MACS *Buffer* (0,75% BSA, 2 mM EDTA em PBS, pH 7,2-7,4), juntando as triplicatas para nova centrifugação nas mesmas condições. Após esse procedimento, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais (BD), anti-CD3 APC-Cy7 (1:50), anti-CD4 PerCP-Cy5.5 (1:100) e anti-CD8 PE-Cy7 (1:100), durante 30 minutos a 4°C, protegido da luz. Em seguida, foram centrifugadas novamente e ressuspensas em 200 μ L de MACS *Buffer* e transferidas para tubos específicos para o citômetro de fluxo (FACScalibur-Becton Dickinson).

3.5.3. Ajuste das voltagens do citômetro de fluxo

Para o ajuste das voltagens do citômetro de fluxo, foram utilizadas *beads* de compensação comerciais (BD). O preparo foi feito de acordo com as instruções do

fabricante em uma diluição de 1:1 (1 gota de *beads* positiva + 1 gota de *beads* negativa), onde 10 μ L desta solução foram transferidos para microtubos e em cada um foi adicionado um fluorocromo na mesma diluição utilizada para a marcação celular. Após isso, as *beads* foram incubadas por 15 minutos, T.A., protegidas da luz e após a marcação, foram adicionados 200 μ L de MACS *buffer* em todos os tubos para aquisição dos eventos.

3.5.4. Análise dos eventos adquiridos na citometria de fluxo

Os dados gerados pelo citômetro de fluxo, cerca de 100.000 eventos adquiridos, foram analisados pelo software Flowjo 9.4.10, seguindo a estratégia de análise através de “*gates*” exemplificada na figura 8 e os gráficos foram gerados pelo software Sigmaplot 10.0.

Foi feito um *gate* inicial delimitando a população de linfócitos baseado no tamanho (FSC) e na granulosidade (SSC) das células, seguido por um *gate* nas células T CD3⁺. Após isso, fizemos um *gate* para separar as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺) e outro para linfócitos T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺). Dentro dessas subpopulações, foi avaliada a diminuição gradativa da intensidade de fluorescência do CFSE, o que é inversamente proporcional a proliferação celular específica induzida *in vitro*. Os resultados da proliferação celular foram expressos em porcentagem de células proliferando, onde o resultado final é dado pela porcentagem de células proliferativas em resposta ao estímulo *in vitro* menos a proliferação basal das células não estimuladas (CFSE_{LowE} - CFSE_{LowNE}).

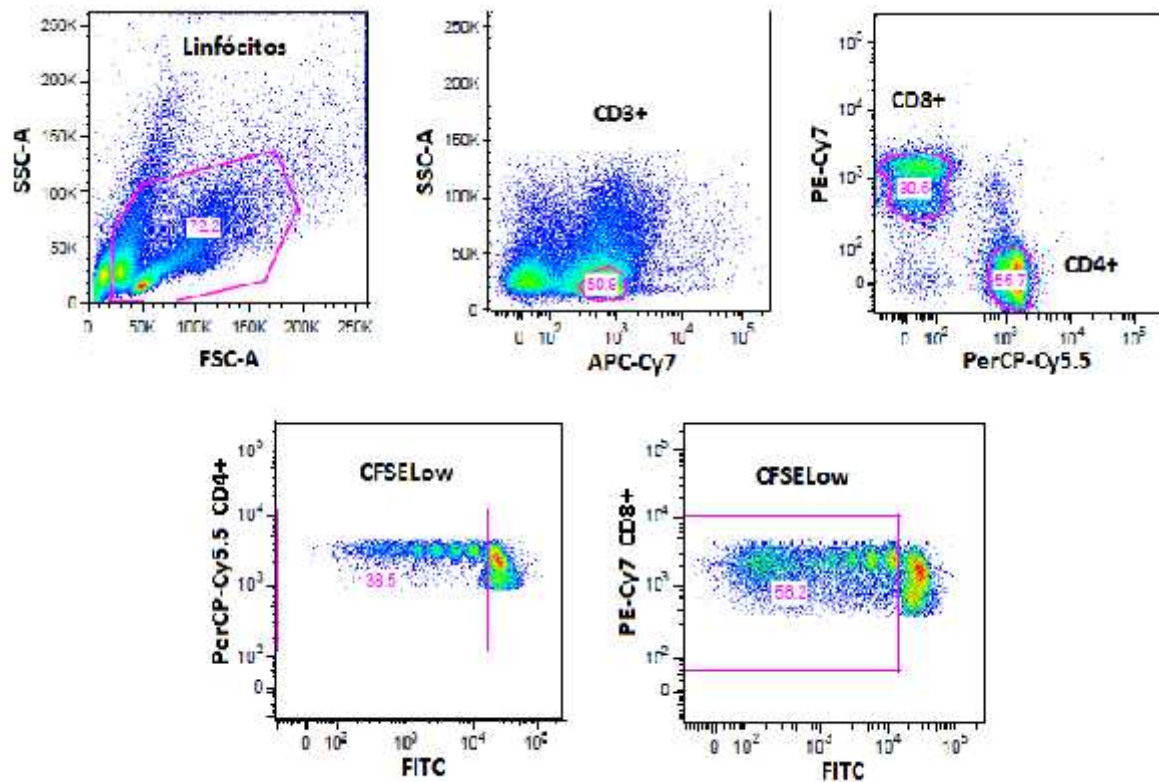


Figura 8: Estratégia de análise para avaliação da proliferação celular utilizando CFSE. Dot plot gerados através da análise pelo software FlowJo de células estimuladas *in vitro* com o mitógeno Con A.

3.5.5. Detecção de IFN- γ por ELISA de captura

Apesar de, inicialmente não proposta neste trabalho, o método de ELISA de captura foi selecionado para avaliar a produção da citocina IFN- γ no sobrenadante de cultura celular. A detecção de IFN- γ foi realizada por ELISA de captura, utilizando-se o kit comercial (RD Systems).

Placas de 96 poços “high binding” (3590, Costar) foram sensibilizadas com 4 μ g/mL de anticorpo de captura anti-IFN- γ diluído em PBS, em um volume final de 100 mL/poço e incubadas a temperatura ambiente durante a noite. Após este período, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween e, em seguida, foi adicionado 200 μ L/poço da solução de bloqueio (BSA 1%, NaN₃ 0,05% em PBS) e

uma nova incubação de 2 horas, a T.A. Em seguida, a solução de bloqueio foi desprezada e acrescentou-se 100 μ L/poço de cada amostra em triplicata, previamente diluída em solução diluente (0.1% BSA, 0.05% Tween 20) em Tampão Tris (20 mM Trizma base, 150 mM NaCl; pH=7.2-7.4), por 2 horas, T.A.

Após esta etapa de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween e adicionou-se 100 μ L/poço do anticorpo de detecção biotilado anti-IFN- γ em uma concentração de 100 ng/mL em solução diluente. Após uma incubação de 2 horas, T.A., as placas foram lavadas 5 vezes e incubadas durante 1 hora com 100 μ L/poço do conjugado estreptavidina diluído 200X em solução diluente. Em seguida as placas foram lavadas novamente 3 vezes e então reveladas com 100 μ L/poço da solução de revelação [9,25 mM OPD (Sigma); 0.1% (v/v) H₂O₂ (Merck)] em tampão fosfato-citrato [200 mM Na₂HPO₄ (Synth), 218 mM C₆H₈O₇ (Synth); pH=4,5-5,0] em uma reação de 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 50 μ L/poço de 4N H₂SO₄ e a DO₄₉₂ foi determinada em um leitor automático de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA).

3.5.6. ELISPOT para IFN- γ

O ensaio de ELISPOT (Enzyme-linked immunosorbent spot) foi selecionado para a avaliação da produção da citocina IFN- γ em camundongos imunizados com os antígenos recombinantes. Esta técnica modificada do ELISA, permite detectar e quantificar células T produtoras de IFN- γ em cultura de células (Miyahira et al., 1995). Para a execução do ensaio utilizamos o protocolo de acordo com Alencar e colaboradores. Basicamente, placas de nitrocelulose de 96 poços (Multiscreen_{HTS}, MSIPS4W, Millipore) foram sensibilizadas com 10 μ g/mL do anticorpo de captura

monoclonal R4 anti-mouse IFN- γ ATCC (BD), diluído em PBS estéril em um volume final de 60 μ l/poço e incubadas durante a noite, à temperatura ambiente. Após incubação, o anticorpo foi removido por aspiração com pipeta *Pasteur* e as placas foram lavadas 3 vezes com 100 μ L de meio RPMI. O bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação foi feito acrescentando-se 100 μ l/poço de meio R10 (RPMI com 10% de SBF), por 2 h a 37°C. Após o bloqueio, o meio foi removido e 5x10⁵/poço das células esplênicas ressuspensas em meio IL-2 [(meio RPMI com o 0,055 mM 2-mercaptoetanol (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 1 mM Piruvato de Sódio (Gibco), 1% Vitaminas-MEM (Gibco), 1% Aminoácidos Não-Essenciais-MEM NEAA (Gibco) e 10% de soro bovino fetal (Gibco) e 0,03% IL-2 (Gibco)] foram incubadas na presença dos estímulos antigênicos de acordo com cada experimento, durante 24h, a 37°C, em estufa com 5% de CO₂.

Após o período de incubação, as células foram descartadas e as placas lavadas 3 vezes com PBS e 5 vezes com PBS-Tween. Foi adicionado, então, o anticorpo anti-mouse biotilado XMG 1.2 (BD) diluído em PBS-Tween na proporção de 1:200, em um volume final de 70 μ L/poço e as placas foram incubadas durante a noite, 4°C, seladas em papel alumínio.

Após a incubação, foram feitas 6 lavagens com PBS-Tween e após isso, adicionou-se 100 μ L/poço de estreptavidina (BD) marcada com peroxidase diluída em PBS-Tween na diluição de 1:500 para um incubação de 2 horas, T.A. Foram feitas 5 lavagens com PBS-Tween e 3 com PBS e então acrescentou-se a solução de revelação (1M Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% (m/v) DAB (Sigma-Aldrich) e 0,1% (v/v) de 30% H₂O₂ Sigma) em um volume final de 100 μ L/poço com tempo de ação de 15 minutos.

A reação foi interrompida após o descarte do substrato e lavagens das placas com água corrente. Após as placas estarem completamente secas, fez-se a contagem dos *spots* em microscópio óptico (Nikon, Alphaphot YS).

3.6. Análise estatística

Para a determinação da média e do erro padrão da média (SEM) dos títulos de anticorpos IgG dos camundongos imunizados, utilizou-se o software GraphPad PRISM 5.0. O mesmo se aplica a média e SEM dos níveis de IFN- γ detectados por ELISA de captura e a média dos *spots* obtidos pelo ensaio de ELISPOT. Para comparar as diferenças estatísticas entre as médias dos títulos de anticorpos IgG, concentração de IFN- γ por ELISA de captura e média dos números de *spots* pelo ELISPOT, foi feita a análise de variância (one-way ANOVA) seguida do teste de Tukey,

4. Resultados

4.1. Expressão e purificação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes AMA1, MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β foram obtidas de acordo com os protocolos pré-estabelecidos pelo grupo, como mencionado nos materiais e métodos. A figura abaixo mostra o perfil de migração por eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) em condições redutoras, utilizando o agente redutor β -mercaptoetanol. Podemos observar que foram produzidas com um padrão de banda única ou majoritária e em bom nível de pureza.

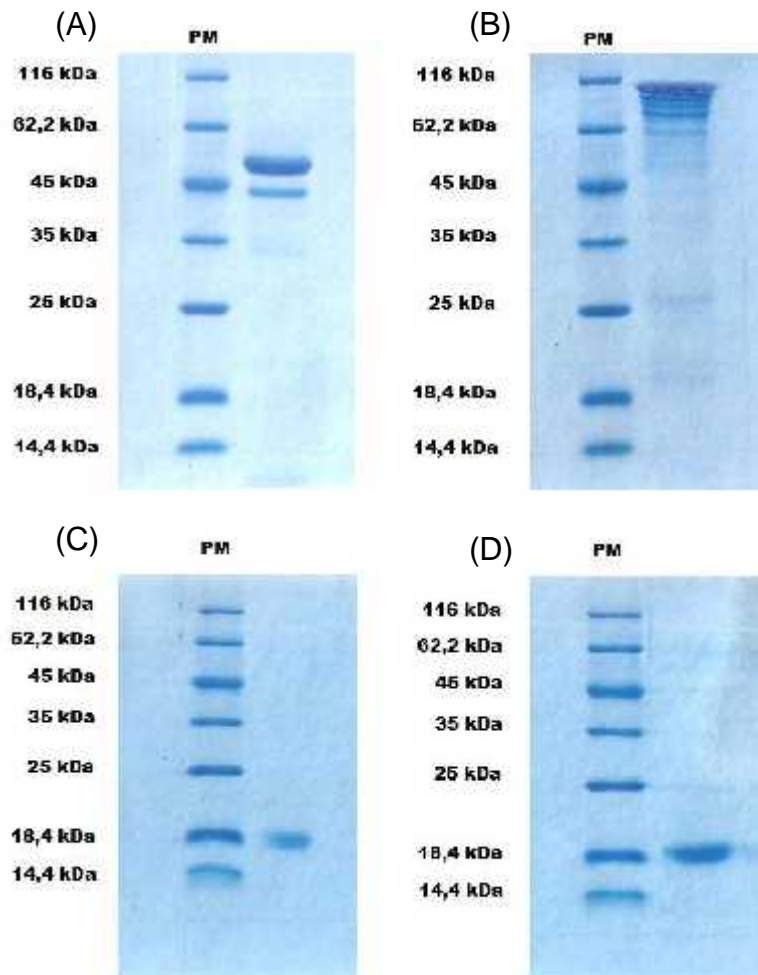


Figura 9: Análise da expressão e purificação das proteínas recombinantes AMA1, MSP3 β , MSP1₁₉ e MSP1₁₉-PADRE em SDS-PAGE: Perfil de migração das proteínas na presença do agente redutor β -mercaptoetanol em gel de poliacrilamida corado com Azul de Coomassie. (A) AMA1 – 53 kDa; (B) MSP3 β – 110 kDa; (C) MSP1₁₉ – 18 kDa e (D) MSP1₁₉-PADRE – 118 kDa.

Após a obtenção das proteínas recombinantes e verificação do nível de pureza por eletroforese, demos início às imunizações experimentais com o objetivo de caracterizar a resposta imune celular induzida pela combinação dos antígenos recombinantes AMA1, MSP1₁₉-PADRE, MSP3 β emulsificados na presença de diferentes adjuvantes.

4.2. Efeito da imunização de camundongos C57BL/6 com as proteínas recombinantes AMA1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β administradas na presença do Adjuvante Incompleto de Freund (AIF).

Inicialmente, o efeito da co-administração dos 3 antígenos recombinantes AMA1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β foi avaliado na presença de um adjuvante forte, AIF. Com base em resultados anteriores obtidos por Rosa e colaboradores, demonstrando que camundongos da linhagem C57BL/6 desenvolvem uma forte resposta de células T para o epítipo PADRE (Rosa et al., 2004), selecionamos estes animais para a avaliação da resposta imune celular. Para isso, os camundongos foram imunizados com 3 doses da formulação contendo 10 μ g de cada um dos antígenos administrados individualmente, ou em combinação, na presença deste adjuvante.

Como apresentado na figura 10 não detectamos proliferação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em resposta ao estímulo *in vitro* com nenhum dos antígenos recombinantes (figura 10A-D), apesar das altas taxas de proliferação de linfócitos (> 50%) estimuladas pelo mitógeno Con A (10E).

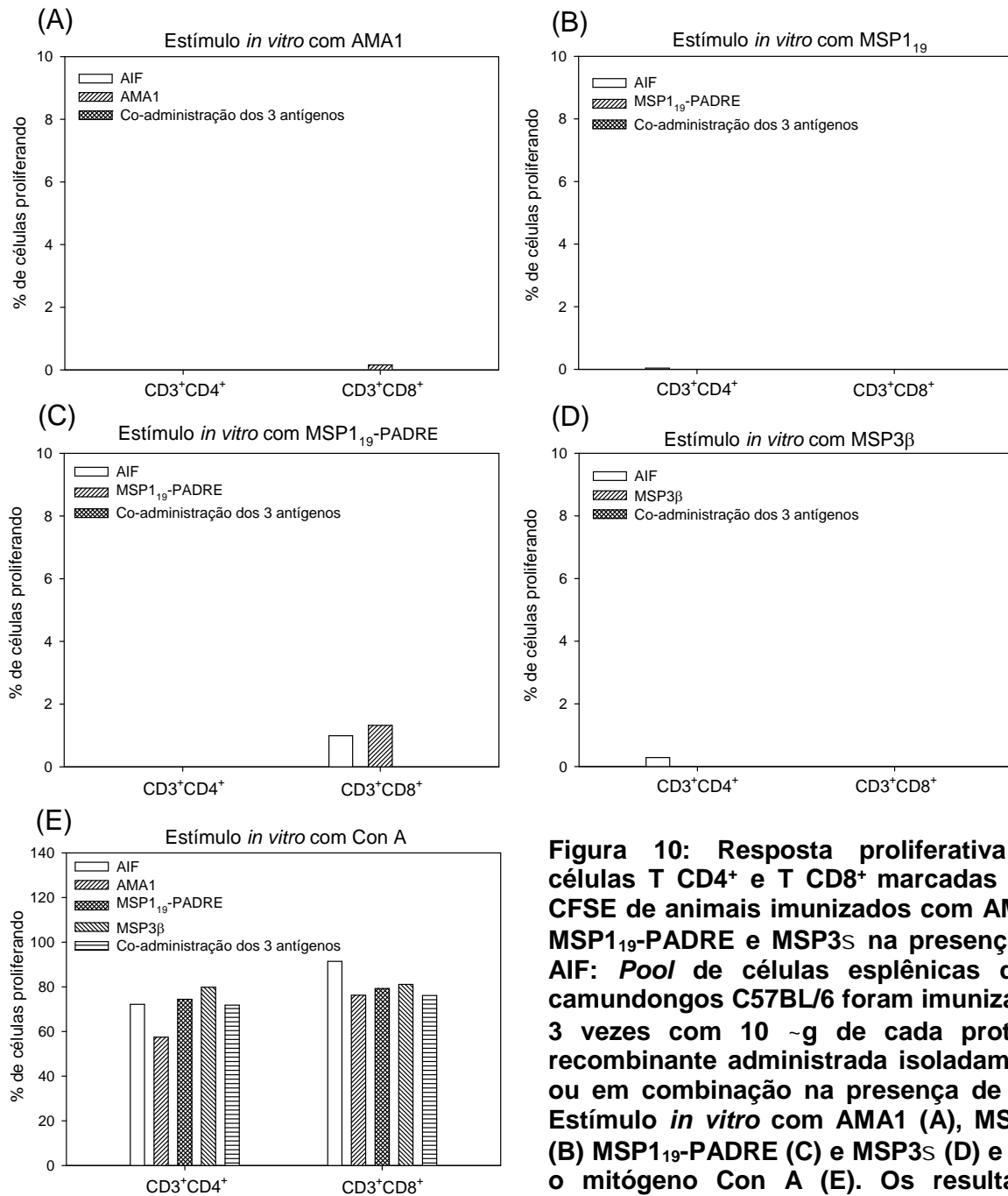


Figura 10: Resposta proliferativa de células T CD4⁺ e T CD8⁺ marcadas com CFSE de animais imunizados com AMA1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3_S na presença de AIF: Pool de células esplênicas de 3 camundongos C57BL/6 foram imunizados 3 vezes com 10 μ g de cada proteína recombinante administrada isoladamente ou em combinação na presença de AIF. Estímulo *in vitro* com AMA1 (A), MSP1₁₉ (B) MSP1₁₉-PADRE (C) e MSP3_S (D) e com o mitógeno Con A (E). Os resultados estão expressos em porcentagem de

células proliferando.

Os títulos de anticorpos IgG específicos contra cada proteína foram determinados por ELISA, após cada uma das 3 doses administradas. A figura 11 (A-C) mostra que altos títulos de anticorpos ($\log_{10} > 5$), foram obtidos ao final do

esquema de imunização (3ª dose) com cada uma das 3 proteínas recombinantes administradas individualmente ou em combinação.

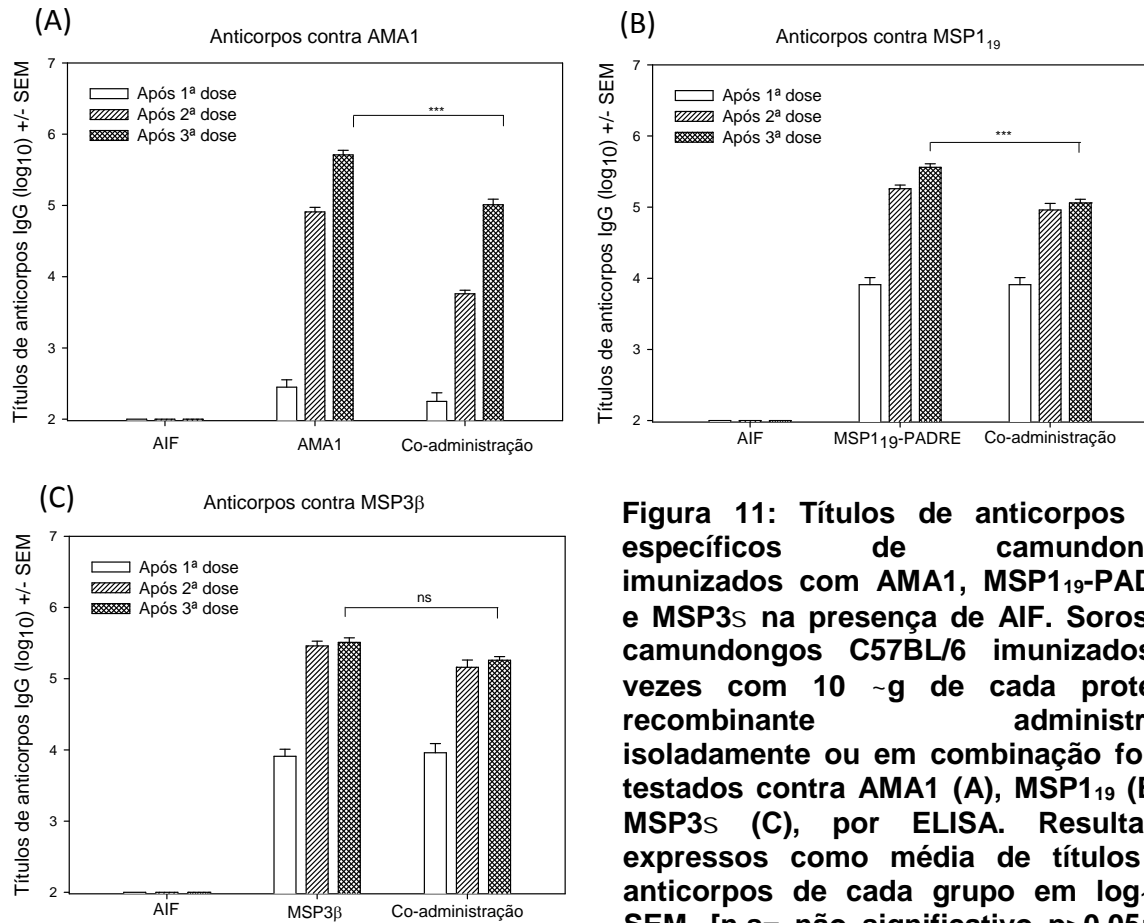


Figura 11: Títulos de anticorpos IgG específicos de camundongos imunizados com AMA1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3_S na presença de AIF. Soros de camundongos C57BL/6 imunizados 3 vezes com 10 ~g de cada proteína recombinante administrada isoladamente ou em combinação foram testados contra AMA1 (A), MSP1₁₉ (B) e MSP3_S (C), por ELISA. Resultados expressos como média de títulos de anticorpos de cada grupo em log₁₀ ± SEM. [n.s.= não significativo p>0,05; (*) =p<0,05; () =p<0,01 e (***) =p<0,001].**

Quando comparamos os títulos de anticorpos dos animais que receberam as proteínas individualmente com os títulos dos que receberam a combinação de antígenos, observamos que os grupos que receberam as proteínas AMA1 e MSP1₁₉-PADRE (figura 11A e 11B) apresentaram títulos de anticorpos significativamente mais altos do que o grupo que recebeu a combinação das 3 proteínas (p<0,001, em ambos os casos), o que significa que a combinação dos 3 antígenos interferiu na resposta para AMA1 e MSP1₁₉. Por outro lado, não observamos diferença

estatisticamente significativa quando comparamos o grupo que recebeu a proteína MSP3 β com o grupo que recebeu a combinação de antígenos (figura 11C, $p > 0,05$).

4.3. Avaliação da resposta celular de camundongos BALB/c imunizados com a proteína AMA1, na presença de AIF: uso de peptídeos sintéticos como estímulo.

Com o objetivo de avaliar se o uso de peptídeos como estímulo *in vitro* não seria uma melhor alternativa às proteínas recombinantes e identificar potenciais epítomos para células T CD4⁺ na proteína AMA1 avaliamos a proliferação de células T em resposta ao estímulo *in vitro* com 4 peptídeos sintéticos preditos para células TCD4⁺ (*PvAMA1* #31, *PvAMA1* #217#219, *PvAMA1* #247#248#249 e *PvAMA1* #396#397), conforme descrito em Material e Métodos.

Para isso, camundongos BALB/c foram imunizados com a proteína AMA1 na presença de AIF. Para a avaliação da resposta imune celular, além do ensaio de proliferação com CFSE, foi realizado o ensaio de ELISA de captura, para a detecção da citocina IFN- γ no sobrenadante da cultura celular. A figura 12 mostra os resultados obtidos através do ensaio de proliferação celular com CFSE.

Não foi observada proliferação específica de células T *in vitro* quando estimuladas pela proteína recombinante (figura 12A), nem pelos peptídeos baseados em AMA1 (figura 12B-F), apesar dos altos percentuais de proliferação celular (>50%) observados em todos os grupos estimulados com Con A (figura 12G).

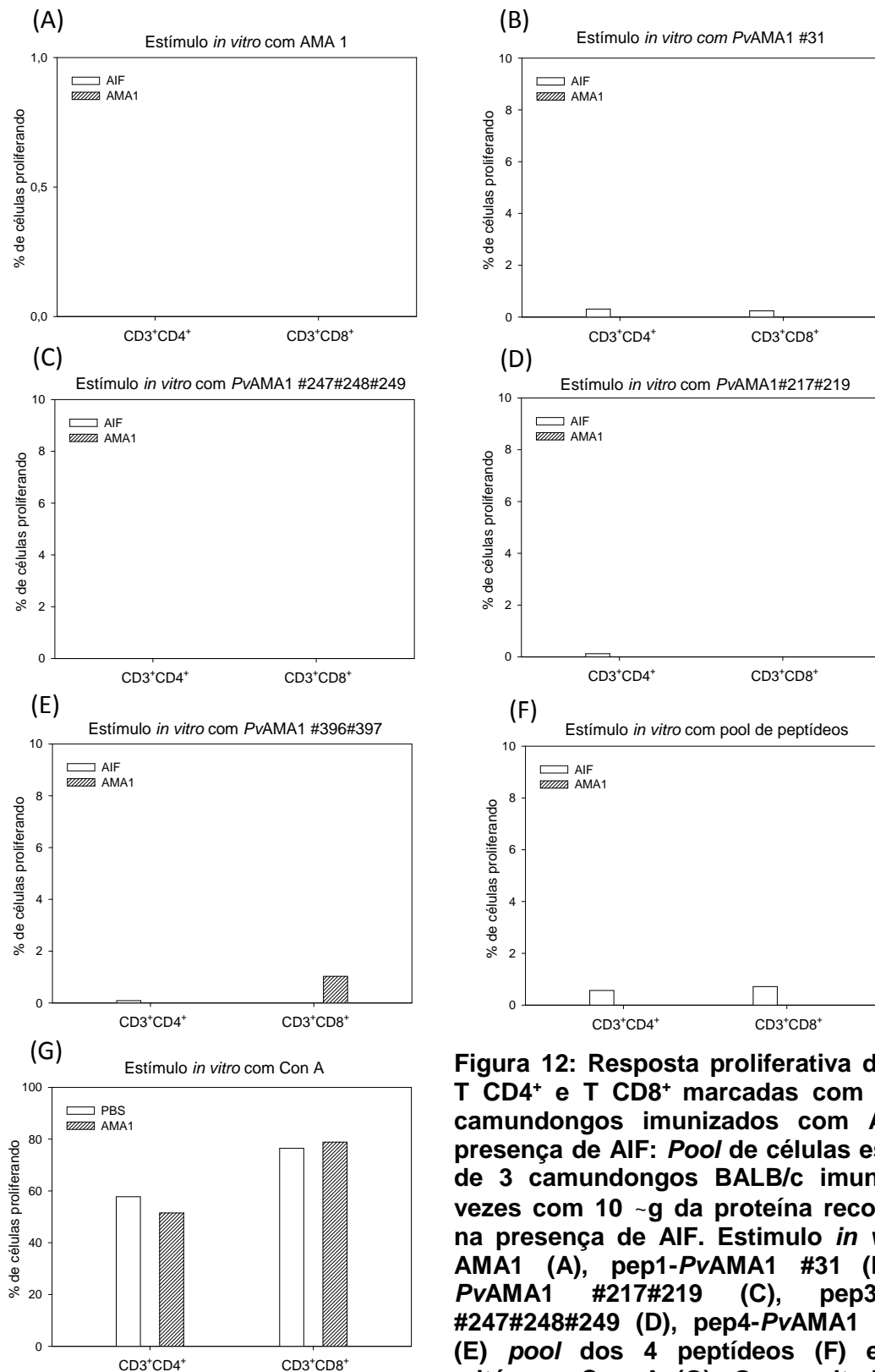


Figura 12: Resposta proliferativa de células T CD4⁺ e T CD8⁺ marcadas com CFSE de camundongos imunizados com AMA1 na presença de AIF: Pool de células esplênicas de 3 camundongos BALB/c imunizados 3 vezes com 10 μ g da proteína recombinante na presença de AIF. Estimulo *in vitro* com AMA1 (A), pep1-PvAMA1 #31 (B) pep2-PvAMA1 #217#219 (C), pep3-PvAMA1 #247#248#249 (D), pep4-PvAMA1 #396#397 (E) pool dos 4 peptídeos (F) e com o mitógeno Con A (G). Os resultados estão

expressos em porcentagem de células proliferando.

Além do ensaio de proliferação com CFSE, o sobrenadante da cultura foi utilizado para a quantificação de IFN- γ produzido pelas células estimuladas, através do ELISA de captura (Figura 13). Os resultados obtidos demonstraram que tanto as células sem estímulo quanto as estimuladas com os antígenos, foram capazes de produzir IFN- γ , não havendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Da mesma forma, não houve, diferença estatisticamente significativa entre o grupo imunizado somente com adjuvante e o grupo que recebeu AMA1 emulsificada em AIF ($p > 0,05$).

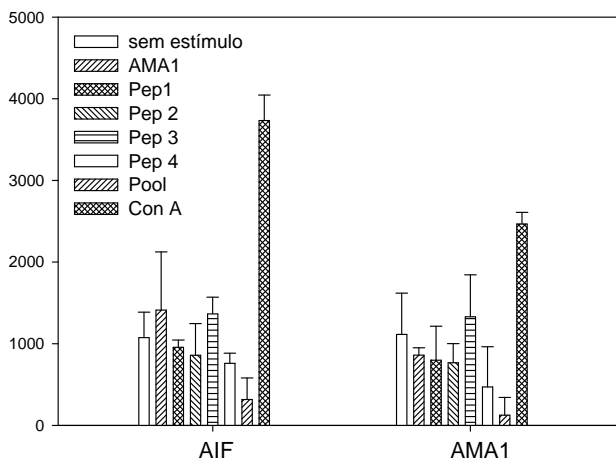


Figura 13: Detecção de IFN- γ por ELISA de captura no sobrenadante de cultura celular: Pool de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados 3 vezes com 10 μ g da proteína recombinante na presença de AIF e estimulados *in vitro* com AMA1, pep 1-PvAMA1 #31, pep 2-PvAMA1 #217#219, pep 3-PvAMA1 #247#248#249, pep4-PvAMA1 #396#397, pool dos 4 peptídeos e com o mitógeno Con A. Os resultados estão expressos em pg/mL.

Como não detectamos resposta proliferativa e o ensaio de ELISA de captura para detecção de IFN- γ não foi conclusivo, resolvemos testar adjuvantes alternativos ao AIF. Para isso, selecionamos a proteína MSP1₁₉-PADRE emulsificada em outros dois adjuvantes (Quil A e Poly I:C), para efeito comparativo de imunogenicidade. Assim, a avaliação da resposta imune celular induzida pela combinação dos 3 antígenos poderia ser novamente investigada utilizando o adjuvante da formulação que apresentasse maior capacidade proliferativa de células T.

4.4. Avaliação da resposta proliferativa induzida pela imunização com a proteína MSP1₁₉-PADRE na presença de Quil A ou Poly (I:C).

Estudos anteriores demonstraram que a proteína MSP1₁₉ ligada ao epítipo PADRE é altamente imunogênica e capaz de estimular proliferação *in vitro* de células T de camundongos C57BL/6 imunizados com MSP1₁₉-PADRE na presença de um adjuvante forte, ACF/AIF (Rosa et al., 2004). No presente trabalho, não foi possível observar proliferação de células T no experimento de imunização com a co-administração dos 3 antígenos na presença de AIF. Sendo assim, imunizações experimentais foram realizadas a fim de avaliar a capacidade de indução de proliferação de células T pela proteína MSP1₁₉-PADRE na presença dos adjuvantes Quil A e Poly (I:C). Trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que o adjuvante Quil A foi capaz de induzir títulos de anticorpos IgG semelhantes ao obtidos com o adjuvante de Freund, após 3 doses de imunização (Vicentin, 2012; Bitencourt et al., 2013).

Na figura 14 observa-se que os animais imunizados com MSP1₁₉-PADRE na presença do adjuvante Poly (I:C) apresentaram proliferação de células T CD4⁺ (9,8%) em resposta ao re-estímulo com a proteína recombinante. Porém proliferação celular em resposta ao estímulo *in vitro* com a MSP1₁₉-PADRE no grupo imunizado com a proteína na presença de Quil A não foi detectada.

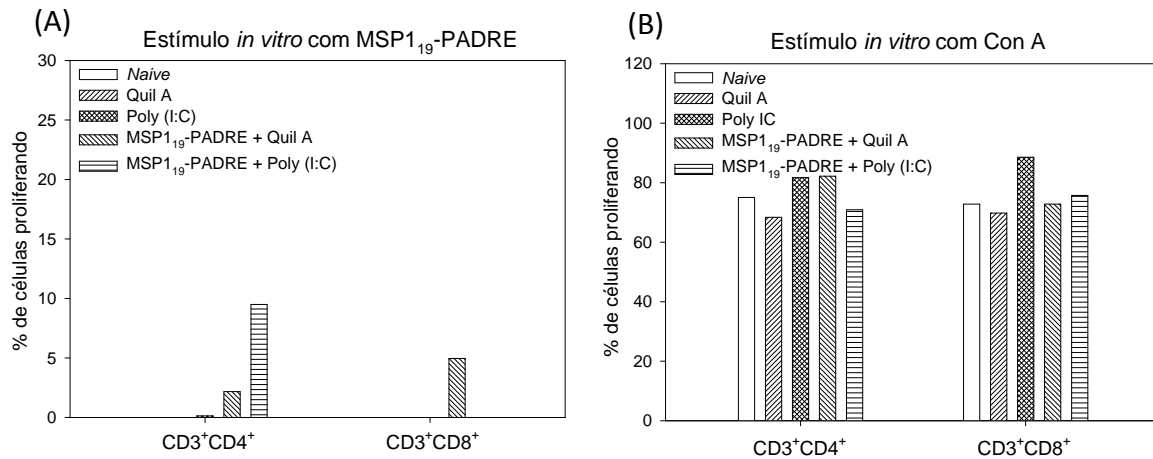


Figura 14: Resposta proliferativa de células T CD4⁺ e T CD8⁺ marcadas com CFSE de camundongos imunizados com MSP1₁₉-PADRE na presença de Quil A ou Poly (I:C): Pool de células esplênicas de camundongos C57BL/6 imunizados 3 vezes com 10 μ g da proteína recombinante MSP1₁₉-PADRE na presença de Quil A ou Poly (I:C). Estímulo *in vitro* com MSP1₁₉-PADRE (A) e Con A (B). Os resultados estão expressos em porcentagem de células proliferando.

Após obtenção desses resultados, selecionamos o adjuvante Poly (I:C) para as imunizações subsequentes.

4.5. Efeito da imunização de camundongos C57BL/6 com as proteínas AMA1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3_{1co} administradas na presença do adjuvante Poly (I:C).

A fim de avaliar o efeito da imunização com as 3 proteínas recombinantes na presença do adjuvante Poly (I:C), as imunizações foram realizadas nas mesmas condições do experimento prévio com o adjuvante AIF (figura 10). Nossos resultados demonstraram que o grupo imunizado com a proteína AMA1 isoladamente apresentou proliferação específica de células T CD4⁺ de 9,9% em resposta ao estímulo com o respectivo antígeno (figura 15A).

O mesmo foi observado no grupo imunizado com MSP1₁₉-PADRE, com 9,8% de proliferação de células T CD4⁺ quando re-estimuladas com o antígeno MSP1₁₉-PADRE (figura 15C). Em contrapartida, o grupo imunizado com a co-administração dos 3 antígenos não foi capaz de proliferar em resposta a nenhum dos estímulos *in vitro*.

O peptídeo PADRE foi capaz de gerar altas taxas de proliferação de células T CD4⁺ no grupo imunizado com MSP1₁₉-PADRE (34,5%). Também foi possível visualizar resposta proliferativa específica de células T CD4⁺ no grupo que recebeu a co-administração dos 3 antígenos (5,7%), porém em porcentagens menores (Figura 15D). Não foi observada proliferação celular específica de células T no grupo imunizado com MSP3 β em resposta ao estímulo *in vitro* com a mesma proteína recombinante (figura 15E).

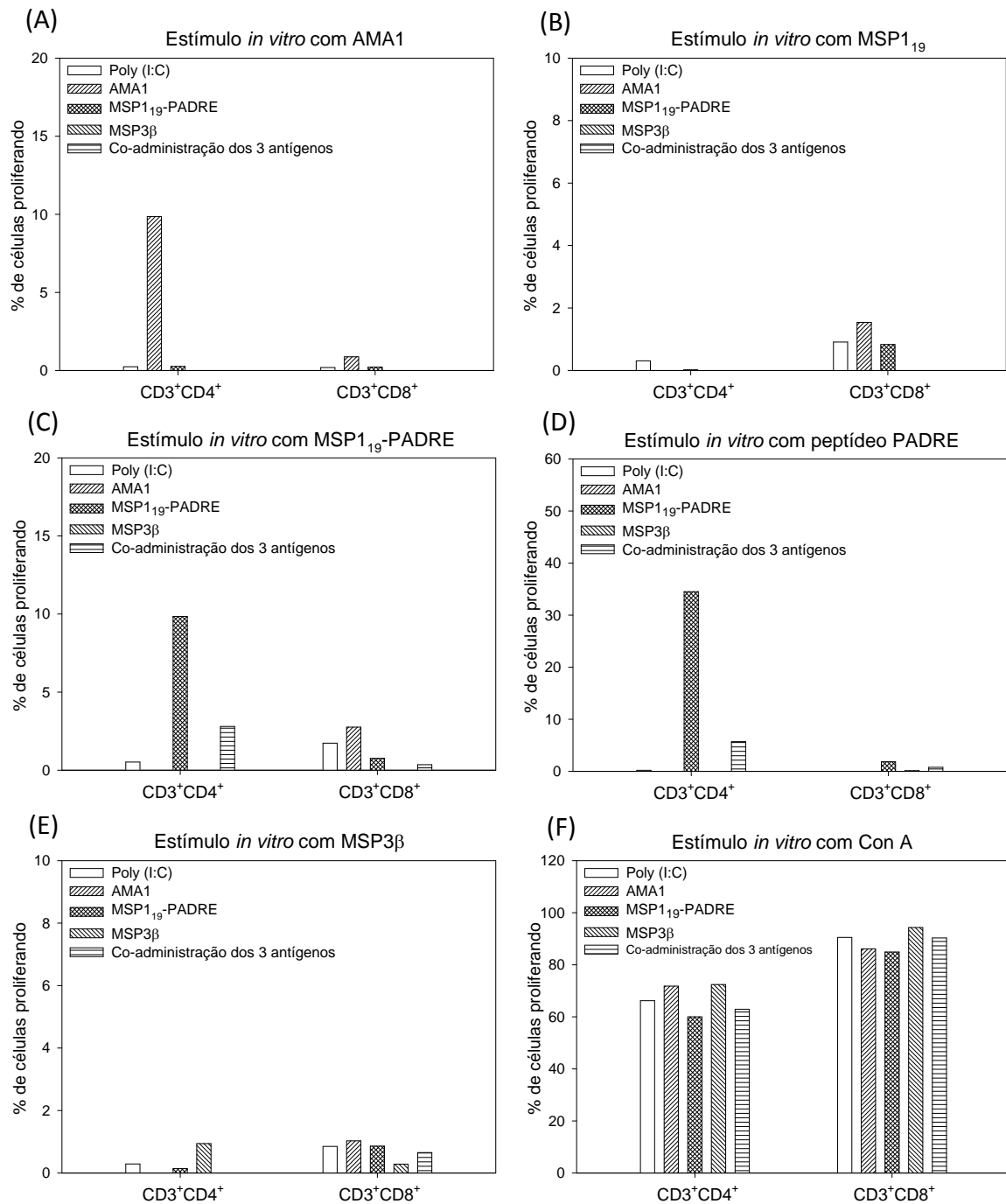


Figura 15: Resposta proliferativa de células T CD4⁺ e T CD8⁺ marcadas com CFSE de camundongos imunizados com AMA1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3_S na presença de Poly (I:C): Pool de células esplênicas de camundongos C57BL/6 imunizados com as proteínas recombinantes administradas isoladamente ou em combinação na presença de Poly (I:C). Estímulo *in vitro* com AMA1 (A), MSP1₁₉ (B) MSP1₁₉-PADRE (C), peptídeo PADRE (D), MSP3_S (E) e com o mitógeno Con A (F). Os resultados estão expressos em porcentagem de células proliferando.

A resposta celular dos animais deste experimento também foi avaliada quanto a produção de IFN- γ por ELISPOT, uma vez que a quantificação de IFN- γ por ELISA de captura não se mostrou específica. Analisando os resultados obtidos, após estímulo *in vitro* com AMA1, observou-se a formação de *spots* apenas nos grupos imunizados com AMA1 e com a combinação dos 3 antígenos, mostrando que a resposta detectada foi específica (figura 16B). Por outro lado, após estímulo *in vitro* com MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β todos os grupos foram capazes de formar *spots*, inclusive o grupo imunizado somente com o adjuvante (figura 16C, D e F), sugerindo uma resposta menos específica.

Quando comparou-se estatisticamente os resultados de ELISPOT, não houve diferença significativa com relação ao número de *spots* formados entre os grupos imunizados com os antígenos isoladamente e o da co-administração após o re-estímulo com as proteínas recombinantes ($p < 0,001$).

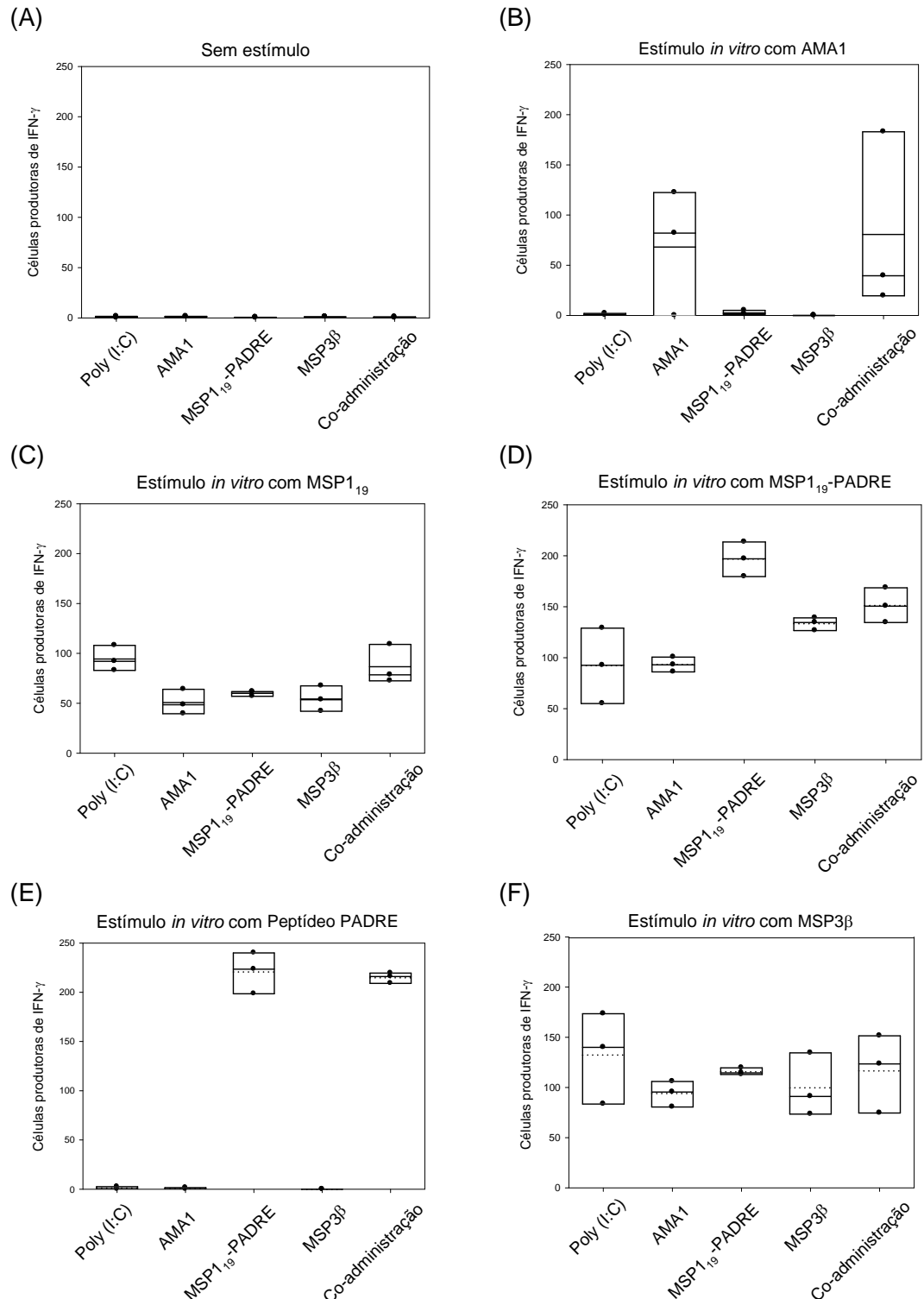


Figura 16: Detecção de IFN- γ por ELISPOT de células de baço de camundongos imunizados com AMA1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β na presença de Poly (I:C): Células esplênicas de três camundongos C57BL/6 imunizados com as proteínas recombinantes administradas isoladamente ou em combinação na presença de Poly (I:C). Células não estimuladas (A), estímulo *in vitro* com AMA1 (B), MSP1₁₉ (C) MSP1₁₉-PADRE (D), peptídeo PADRE (E) e MSP3 β (F). Os resultados estão expressos como mediana (linha pontilhada) da contagem de spots de 3 animais por grupo.

Os resultados obtidos pelo ELISA demonstraram títulos de anticorpos específicos contra cada proteína recombinante, tanto nos grupos imunizados com os antígenos isoladamente quanto no grupo imunizado com a co-administração ($\log_{10}>4$) não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$), diferentemente dos dados obtidos com o experimento onde foi avaliada a co-administração dos 3 antígenos na presença de AIF, quando constatou-se que os grupos que receberam as proteínas AMA1 e MSP1₁₉ emulsificadas em AIF apresentaram títulos de anticorpos significativamente mais altos do que o grupo que recebeu a combinação das 3 proteínas (figura 10).

4.6. Efeito comparativo da imunização de camundongos C57BL/6 e BALB/c com a proteína de fusão AMA1-MSP1₁₉ emulsificada no adjuvante Poly (I:C).

Uma vez que o ELISPOT mostrou-se mais sensível e específico para detecção de resposta celular após imunização com a combinação dos 3 antígenos, resolvemos explorar esse ensaio para avaliar o efeito do uso combinado de 2 dos 3 antígenos testados. Em um estudo recente desenvolvido em nosso laboratório, foi produzida uma proteína quimérica expressa em leveduras da espécie *P. pastoris*, baseada na fusão dos antígenos AMA1 e MSP1₁₉ de *P. vivax* (AMA1-MSP1₁₉). Os resultados preliminares da avaliação da imunogenicidade desta proteína demonstraram sua capacidade para gerar altos títulos de anticorpos em camundongos (Rocha et al., 2012). Sendo assim, realizamos a detecção de IFN- γ por ELISPOT, induzida pela imunização de camundongos C57BL/6 e BALB/c com a proteína AMA1-MSP1₁₉ administrada na presença de Poly (I:C), visando a comparação entre a resposta produzida pela proteína de fusão e a combinação dos 2 antígenos (AMA1 e MSP1₁₉).

Na figura 17 é possível observar que em todos os grupos, inclusive o grupo controle (imunizado apenas com o adjuvante), detectou-se produção de IFN- γ pelo estímulo *in vitro* com a proteína MSP1₁₉ (figura 17C e D). Porém, quando estimulados com a proteína AMA1 apenas os grupos imunizados com AMA1, AMA1-MSP1₁₉ e com a co-administração dos 2 antígenos, produziram IFN- γ (figura 17E e F), o que evidencia uma resposta mais específica quando comparada com a proteína MSP1₁₉. Estes resultados apresentaram-se de forma semelhante nas linhagens C57BL/6 (coluna à esquerda) e BALB/c (coluna à direita).

Para avaliar se houve diferença na produção de IFN- γ entre os grupos imunizados com a proteína de fusão AMA1-MSP1₁₉ e a co-administração de AMA1 e MSP1₁₉, comparou-se estatisticamente o número de *spots* observados. Na linhagem C57BL/6, o número de *spots* do grupo que recebeu a proteína de fusão foi significativamente maior do que o grupo que recebeu a co-administração de AMA1 e MSP1₁₉, quando estimulados *in vitro* com AMA1 ($p < 0,01$, figura 17E). Além disso, comparando-se os grupos imunizados com as proteínas individualmente e o grupo da co-administração dos 2 antígenos, houve uma diminuição significativa no número de *spots* formados no grupo que recebeu a combinação, quando re-estimulados com AMA1, em ambas as linhagens ($p < 0,01$) (figura 17E e F). Por outro lado, quando comparamos os grupos imunizados somente com a proteína AMA1 com o grupo que recebeu a proteína de fusão AMA1-MSP1₁₉, este efeito não foi observado para a linhagem C57BL/6 ($p > 0,05$, figura 17E). Estes dados mostram que o uso de proteínas fusionadas pode solucionar possíveis problemas de competição antigênica. Com relação ao re-estímulo *in vitro* com MSP1₁₉, não houve diferença

estatisticamente significativa entre estes dois grupos em nenhuma das linhagens testadas ($p > 0,05$, figuras 17C e D).

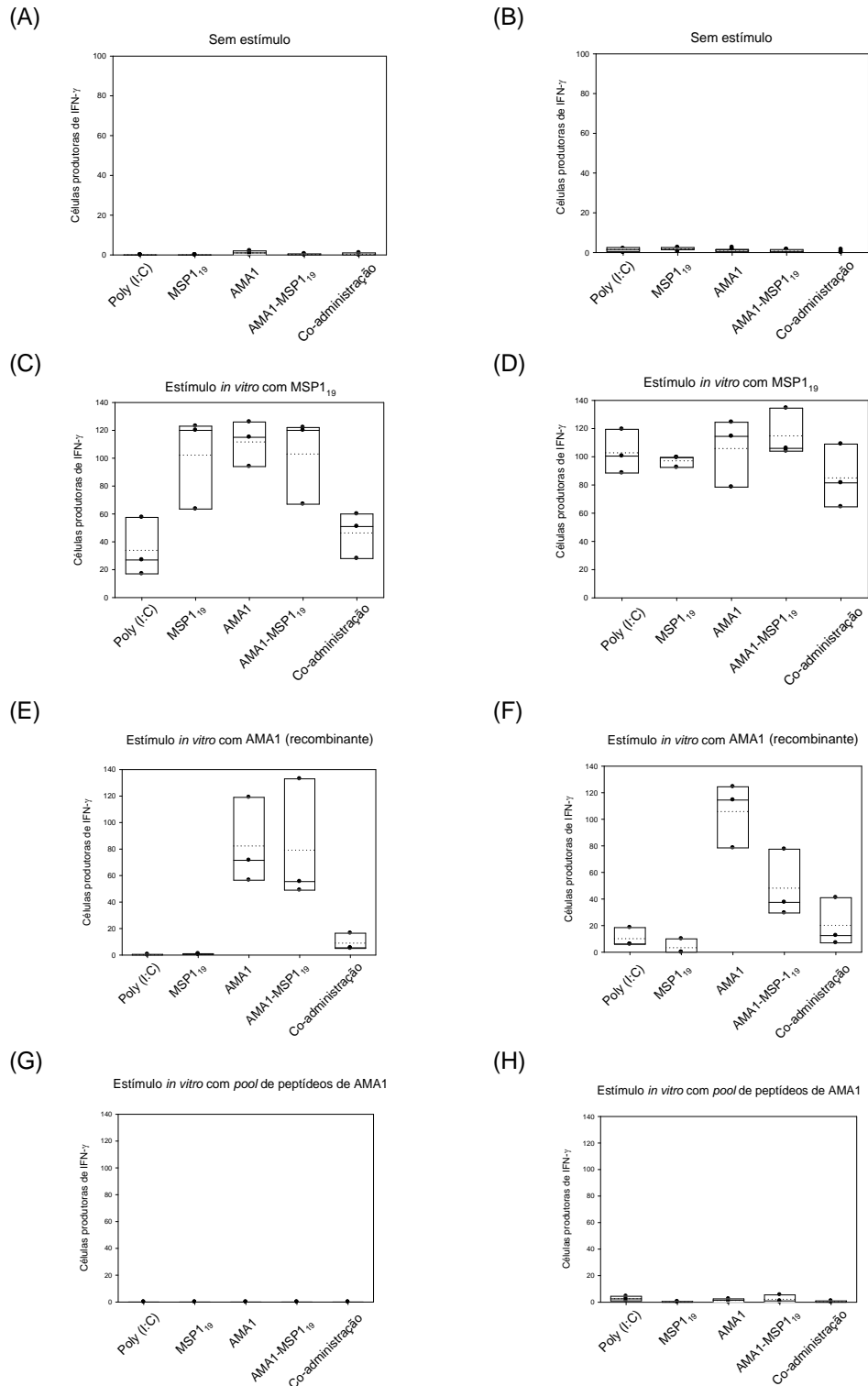


Figura 17: Detecção de IFN- γ por ELISPOT de células de baço de camundongos imunizados com AMA1-MSP1₁₉ na presença de Poly (I:C). Células esplênicas de três camundongos C57BL/6 (coluna à esquerda) e BALB/c (coluna à direita) imunizados com MSP1₁₉, AMA1, AMA1-MSP1₁₉ e a combinação dos 2 antígenos. Células não estimuladas (A) e (B), estímulo *in vitro* com MSP1₁₉ (C) e (D) AMA1 (E) e (F) e peptídeos de AMA1 (G) e (H). Os resultados estão expressos em células produtoras

de IFN- γ . Os resultados estão expressos como mediana (linha pontilhada) da contagem de spots de 3 animais por grupo.

Neste experimento, também foi feito o estímulo *in vitro* com peptídeos para células T CD4⁺ de AMA1 utilizados anteriormente em ensaios de proliferação com CFSE e ELISA de captura. Nossa intenção foi avaliar a produção de IFN- γ pelo método de ELISPOT a fim de confirmar os resultados obtidos. Nas figuras 17G e 17H observamos que não houve indução de células produtoras de IFN- γ pelo estímulo *in vitro* com o *pool* dos peptídeos de AMA1 em nenhuma das linhagens de camundongos. Com esses dados, não foi possível caracterizar a resposta imune celular induzida pelo estímulo em cultura com antígenos potencialmente ligantes de células T CD4⁺ baseados na proteína AMA1 de *P. vivax*.

5. Discussão

A formulação de vacinas contra patógenos que causam infecções importantes para a saúde humana é uma das maiores preocupações dos sistemas de saúde do mundo. Dentre essas doenças, a malária está classificada como uma das três principais, juntamente com a AIDS e tuberculose. Várias medidas estão sendo utilizadas hoje no combate à malária, porém, apesar da diminuição do número de casos e morte, tais estratégias ainda não são suficientes para o controle da doença (WHO, 2012). Por isso, é de extrema necessidade o desenvolvimento de vacinas capazes de diminuir as taxas de morbidade e mortalidade ainda bastante elevadas. Vacinas que têm como alvos merozoítos e eritrócitos infectados podem diminuir a parasitemia a níveis que não permitam o desenvolvimento da doença sendo que formulações baseadas na combinação de antígenos são estratégias importantes no desenvolvimento de vacinas (Riley; Stewart, 2013).

Os maiores investimentos na busca de uma vacina contra malária ainda continuam sendo direcionados ao *P. falciparum*. Poucos são os grupos envolvidos em pesquisas com *P. vivax*. Apesar de notavelmente menos agressivo, muitos já consideram que o termo “benigno” pode subestimar as complicações causadas por esta espécie (revisado por Galinski; Barnwell, 2008). No Brasil, o *P. vivax* é a espécie mais frequente, responsável por 87% dos casos (WHO, 2012), e apesar de poucos, alguns relatos de complicações tornam-se preocupante (Alexandre et al., 2010, Raposo et al., 2013)

Ao longo desses anos, nosso grupo vem estudando a imunogenicidade de várias proteínas recombinantes de *P. vivax*. Dentre elas, destacam-se as proteínas derivadas de AMA1, MSP1 e MSP3, bastante exploradas em estudos pré-clínicos com diferentes formulações de adjuvantes (Cunha et al., 2001; Soares; Rodrigues,

2002; Rosa et al., 2004; Bargieri et al., 2008; Múfalo et al., 2008, Gentil et al., 2010; Vicentin, 2012; Bitencourt et al., 2013).

Sabe-se que, devido ao complexo ciclo do *Plasmodium sp*, a resposta imune precisa mobilizar tanto a resposta humoral quanto a celular no controle da doença (revisado por Tsuji, 2009). Durante a fase eritrocítica as células T CD4⁺ são capazes de restringir o crescimento do parasita através da secreção de citocinas e consequente ativação de macrófagos, além disso estimulam células B a produzirem anticorpos. A interação entre as células T CD4⁺ e T CD8⁺ e a regulação desta resposta é importantíssima para o desenvolvimento eficaz da imunidade contra a malária. Sendo assim, a resposta imune celular desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da imunidade à malária (revisado por Spence; Langhorne, 2012). Porém estes mecanismos ainda não foram totalmente esclarecidos. Sendo assim, nosso objetivo neste trabalho foi caracterizar a resposta imune celular induzida pela co-administração dos três antígenos recombinantes do merozoíto, na presença de adjuvantes, como proposta para uma vacina contra malária.

Como primeira etapa deste estudo, as proteínas recombinantes AMA1, MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β , foram obtidas com sucesso, em bom nível de pureza, de acordo com os protocolos pré-estabelecidos pelo grupo (Cunha et al., 2001; Rodrigues et al., 2005; Jimenez et al., 2007). Após a obtenção das proteínas recombinantes, demos início aos experimentos de imunização para caracterizar a resposta imune celular induzida pela combinação dos 3 antígenos.

Primeiramente, selecionamos o Adjuvante Incompleto de Freund, por ser ainda considerado como o adjuvante de maior potencial na indução de resposta imune (Miller et al., 2005), a fim de compararmos os resultados com a resposta

celular obtida através da combinação das 3 proteínas na presença de outros adjuvantes. Vale ressaltar que a linhagem de camundongos C57BL/6 foi escolhida para ser utilizada em todos os experimentos com a co-administração, baseando-se em resultados anteriores que demonstraram uma resposta proliferativa de células T bastante forte em resposta ao re-estímulo com o peptídeo PADRE (Cunha et al., 2001; Rosa et al., 2004). Analisando os resultados do ensaio de proliferação celular com CFSE obtidos neste estudo, não foi possível observar proliferação de células TCD4⁺ e TCD8⁺ em resposta ao estímulo *in vitro* com nenhum dos antígenos recombinantes. Estudos avaliando a imunogenicidade da proteína MSP1₁₉-PADRE emulsificada no Adjuvante Completo de Freund (ACF), demonstraram através da técnica de incorporação por timidina que esta proteína é capaz de induzir proliferação de células T e produção de IFN- γ em resposta ao re-estímulo com MSP1₁₉-PADRE, em camundongos C57BL/6 (Cunha et al., 2001; Rosa et al., 2004). Por outro lado, os títulos de anticorpos IgG específicos contra AMA1, MSP1₁₉ e MSP3 β foram semelhantes aos obtidos em estudos anteriores (Cunha et al., 2001; Rosa et al., 2004; Vicentin, 2012; Bitencourt et al., 2013). Isso demonstra que apesar de não ter sido gerada proliferação celular pelo re-estímulo com os antígenos recombinantes, as imunizações foram administradas com sucesso.

Com o avanço da bioinformática e a introdução da chamada vacinologia reversa, tornou-se bastante comum a identificação de novos epítomos de células T através da análise *in silico*, visando a concepção de vacinas contra doenças infecciosas e até mesmo o câncer. A utilização de epítomos imunodominantes em formulações vacinais apresenta a vantagem de potencializar o direcionamento da

resposta imune contra alvos altamente imunogênicos (revisado por Rosa et al., 2010).

Em virtude dos resultados obtidos com a co-administração dos 3 antígenos recombinantes juntamente com o adjuvante AIF, decidiu-se investigar se a resposta proliferativa de células T seria melhor induzida pelo estímulo *in vitro* com peptídeos para células T CD4⁺ baseados na proteína PvAMA1, obtidos anteriormente pelo laboratório: PvAMA1 #31, PvAMA1 #217#219, PvAMA1 #247#248#249 e PvAMA1 #396#397, com perfil de antigenicidade para três alelos de MHC de classe II de camundongos BALB/c (H2-IAb, H2-IAd, H2-IEd). Para isso camundongos BALB/c foram imunizados com a proteína AMA1 na presença de AIF, a fim de compararmos os resultados da resposta proliferativa anteriormente obtidos nesta linhagem (Vicentin, 2012). Os resultados demonstraram que nenhum dos estímulos testados *in vitro* foi capaz de induzir proliferação específica de células T, inclusive a própria proteína recombinante AMA1, apesar das altas porcentagens observadas de proliferação celular em todos os grupos estimulados com o mitógeno Con A (> 50%).

Além do ensaio de proliferação celular com CFSE, o sobrenadante da cultura foi utilizado para a quantificação de IFN- γ produzido pelas células estimuladas, através de ELISA de captura. Sabe-se que esta citocina desempenha um papel fundamental na resposta imune celular atuando na ativação de macrófagos, sendo bastante importante na fase eritrocítica da doença (revisado por Stevenson e Riley, 2004). Analisando os resultados obtidos por ELISA de captura, não foi possível detectar produção específica de IFN- γ pelos camundongos imunizados com a proteína AMA1, pois o *background* apresentou-se elevado. Todas as células estimuladas e não estimuladas produziram IFN- γ , não havendo diferença

entre o grupo imunizado apenas com o adjuvante e o imunizado com a proteína AMA1. Infelizmente, o mesmo perfil de resposta de citocina IFN- γ foi observado por Vicentin em 2012. Por esta razão, nossa proposta foi avaliar a secreção de IFN- γ por outro método, o ELISPOT, onde a quantificação feita é por número de células produzindo IFN- γ , ao contrário do ELISA de captura, que mede a quantidade de IFN- γ no sobrenadante.

É importante notar que os títulos de anticorpos induzidos pela imunização com a proteína AMA1 na presença de AIF apresentarem-se similares aos obtidos em nosso laboratório (Múfalo et al., 2008; Vicentin 2012). Além disso, o controle positivo com o mitógeno Con A induziu resposta proliferativa de células T > 50% e produção de IFN- γ . Porém, não houve oportunidade para averiguarmos se houve um possível comprometimento da estrutura celular causado talvez pela manipulação durante o experimento ou outros fatores que possam ter refletido diretamente nos resultados.

Bouilet e colaboradores, avaliaram protocolos homólogos e heterólogos de vacinação com a proteína recombinante PvAMA1 e o Adenovírus humano tipo 5 codificando PvAMA1 (Ad PvAMA1), em camundongos BALB/c. Diferentemente do observado em nossos experimentos, verificou-se resposta proliferativa de células TCD4⁺ ao estímulo *in vitro* com AMA1 em todos os protocolos, inclusive no homólogo com a proteína administrada em Montanide ISA 720 (Bouilet et al., 2011).

A proteína MSP1₁₉ de *P. vivax* vem sendo bastante estudada principalmente pelo nosso grupo. Rosa e colaboradores demonstraram que esta proteína ligada ao epítipo PADRE é altamente imunogênica e capaz de estimular proliferação *in vitro* de células T em camundongos C57BL/6 imunizados com MSP1₁₉-PADRE na

presença do ACF (Rosa et al., 2004). Como mostrado anteriormente, não foi observada proliferação de células T no experimento de imunização com a co-administração dos 3 antígenos na presença de AIF. Sendo assim, foi nossa proposta avaliar a capacidade de indução de proliferação de células T pela proteína MSP1₁₉-PADRE na presença de outros dois adjuvantes. Um deles foi o Quil A, pois além de já ser liberado para uso veterinário (Haçariz et al., 2009; Heath et al., 2012), trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que a proteína AMA1 (Vicentin, 2012) e MSP3 β (Bitencourt et al., 2013) administradas na presença deste adjuvante, foram capazes de induzir títulos de anticorpos IgG semelhantes aos obtidos com o adjuvante de Freund. O outro foi o adjuvante Poly (I:C), que já se encontra em estudos clínicos de fase 1 (Okada et al., 2011; Sabatini et al., 2012). Para isso, camundongos C57BL/6 foram imunizados com 3 doses da proteína MSP1₁₉-PADRE emulsificada em Quil A ou Poly (I:C). Os resultados obtidos com o ensaio de proliferação com CFSE mostraram que o grupo de animais imunizados com a proteína recombinante na presença do adjuvante Poly (I:C), apresentou proliferação específica de células T CD4⁺, em resposta ao estímulo *in vitro* com o MSP1₁₉-PADRE o que não foi observado no grupo imunizado com este antígeno na presença de Quil A. De fato, alguns trabalhos confirmam o potente papel adjuvante do Poly(I:C) na promoção da resposta imune celular. Trumpfheller e colaboradores investigaram a proposta de uma formulação contendo a região p24 da proteína gag do vírus HIV fusionada ao anticorpo contra a molécula DEC-205 expressa por células dendríticas (α -DEC-p24). O objetivo foi intensificar a resposta celular utilizando como adjuvantes o Poly (I:C) em um protocolo de vacinação do tipo *prime-boost* homólogo em camundongos C57BL/6 e BALB/c. Após duas doses, foi

observado uma resposta proliferativa intensa e duradoura de células TCD4⁺ com produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 ao re-estímulo com p24 detectada através de citometria de fluxo (Trumpfheller et al., 2008). Outro estudo recentemente publicado em primatas não humanos da espécie *Macaca mullata* demonstrou que a formulação vacinal contendo a proteína gag do vírus SIV emulsificada em Poly(I:C) administrada como *prime* seguida de um *boost* com Adenovírus expressando a mesma proteína foi capaz de gerar uma forte resposta de células TCD4⁺ quando comparado com os outros adjuvantes testados (Park et al., 2013).

Sendo assim, selecionamos o adjuvante Poly (I:C) para darmos continuidade às imunizações experimentais com o objetivo de caracterizar a resposta imune celular induzida pela co-administração dos antígenos recombinantes AMA1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β . Os resultados obtidos com o ensaio de proliferação celular com CFSE demonstraram que células T CD4⁺ de camundongos C57BL/6 imunizados com as proteínas isoladamente foram capazes de proliferar especificamente ao estímulo *in vitro* com os respectivos antígenos recombinantes homólogos, AMA1, MSP1₁₉-PADRE. Porém o grupo imunizado com a co-administração não apresentou proliferação celular específica aos estímulos *in vitro*, exceto quando estimulado com o peptídeo PADRE que foi capaz de induzir discreta proliferação de células T neste grupo. Como o peptídeo PADRE é universal para células TCD4⁺ (Alexander et al., 1994), e não pertence ao parasito da malária, é sensato dizer que não foi detectada resposta proliferativa pelo estímulo *in vitro* com nenhum dos antígenos recombinantes no grupo imunizado pela combinação das 3 proteínas. Uma possível competição entre os 3 antígenos combinados deve ser considerada para a inibição

da resposta proliferativa de células T avaliada por um método mais específico, como o ensaio com CFSE.

Analisando os resultados obtidos através do ensaio de ELISPOT, observamos que o grupo que recebeu a co-administração das 3 proteínas produziu IFN- γ em resposta a todos os estímulos *in vitro*. Porém somente a quantificação de IFN- γ em resposta ao estímulo com a proteína AMA1 demonstrou-se de maneira específica, sendo detectada nos grupos imunizados com AMA1 e com a co-administração dos 3 antígenos. Interessantemente, as proteínas MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β estimularam células produtoras de IFN- γ em todos os grupos, com a mesma intensidade de resposta, inclusive nos animais imunizados apenas com o adjuvante Poly (I:C). Isto pode estar relacionado com o sistema de expressão desses antígenos. AMA1 foi expressa de forma secretada em leveduras da espécie *P. pastoris*, diminuindo a presença de possíveis contaminantes. Já as proteínas MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β , foram expressas em *E. coli*, sendo possível assim que contaminantes da própria bactéria, tenham interferido na especificidade da resposta celular.

Em 2010, um estudo desenvolvido em primatas não humanos da espécie *Macaca mulatta*, demonstrou, através de citometria de fluxo, que a proteína recombinante PfCSP expressa em *E. coli*, quando administrada na presença de Poly (I:C) é também capaz de induzir a resposta de células T CD4⁺ produtoras de citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ (Tewari et al., 2010).

Outra estratégia bastante utilizada no desenvolvimento de vacinas de subunidades é a concepção de proteínas quiméricas resultantes da fusão de antígenos potencialmente imunogênicos. Pesquisas recentes realizadas em nosso

laboratório produziram uma proteína quimérica em leveduras da espécie *P. pastoris*, baseada na fusão dos antígenos AMA1 e MSP1₁₉ de *P. vivax* (AMA1-MSP1₁₉). Os resultados preliminares da avaliação da imunogenicidade desta proteína demonstraram altos títulos de anticorpos em camundongos C57BL/6 e BALB/c (Rocha et al., 2012). De maneira geral, nossos resultados obtidos com ELISPOT mostraram que a imunização com a proteína fusionada na presença de Poly (I:C) foi capaz de induzir células produtoras de IFN- γ em resposta ao estímulo *in vitro* com MSP1₁₉ e AMA1. Nossos resultados são compatíveis com dados gerados a partir de um estudo em *P. falciparum* onde produziu-se e avaliou-se a imunogenicidade de uma proteína quimérica baseada na fusão de AMA1 e MSP1₁₉. Os resultados indicaram maior imunogenicidade da proteína de fusão quando comparada com a administração dos antígenos em combinação (Faber et al., 2007).

Comparando-se o número de *spots* formados entre os grupos imunizados com AMA1-MSP1₁₉ e a co-administração de AMA1 e MSP1₁₉ não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quando estimulados *in vitro* com ambos os antígenos, na linhagem BALB/c. Porém, na linhagem C57BL/6, o grupo imunizado com AMA1-MSP1₁₉ apresentou maior número de células produtoras de IFN- γ em resposta ao estímulo *in vitro* com MSP1₁₉ e AMA1 do que o grupo que recebeu a co-administração dos antígenos. Isto demonstra que a fusão de antígenos imunogênicos também pode ser uma alternativa vantajosa no desenvolvimento de vacinas de subunidade. Verificou-se também uma diminuição pela combinação dos 2 antígenos (AMA1 e MSP1₁₉) na produção de IFN- γ em resposta ao estímulo com AMA1 em ambas as linhagens ($p < 0,001$) quando comparada com a administração do antígeno isoladamente. Porém, na avaliação da combinação dos 3 antígenos

(AMA1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β) na presença de Poly (I:C), não foi observado esse efeito de diminuição da produção de IFN- γ pelo grupo imunizado com a co-administração em relação aos grupos imunizados com as proteínas recombinantes isoladamente, não havendo diferença estatisticamente entre os grupos ($p > 0,05$).

Na literatura o número de trabalhos com combinações de antígenos imunogênicos não é muito grande. Porém alguns estudos pré-clínicos e clínicos mostram resultados promissores na indução da resposta imune utilizando-se esta estratégia. Um estudo em camundongos, publicado em 2003, mostrou que formulações vacinais combinando *PcAMA1* e *PcMSP1₄₂* com diferentes adjuvantes induziram níveis elevados de proteção contra infecções por *P. chabaudi*, gerando níveis moderados de anticorpos IgG e mostrando-se bastante eficaz na diminuição da parasitemia dos animais desafiados com o parasito (Burns et al., 2003). Genton e colaboradores demonstraram em 2003 que a combinação de 3 proteínas recombinantes de *P. falciparum* derivados de fortes candidatos à vacina, RESA, MSP1, MSP2, administrados na presença do adjuvante Montanide ISA 720, reduziu em 62% a carga parasitária em crianças (Genton et al., 2003). Várias outras formulações vacinais utilizando a combinação de antígenos ou a fusão destes encontram-se em estudos clínicos (Ellis et al., 2012, Mamo et al., 2013). Nossos dados gerados por ELISPOT demonstram que a combinação de antígenos de fase sanguínea de *P. vivax*, assim como a fusão são estratégias interessantes na indução da resposta celular se considerarmos a vantagem de uma formulação vacinal composta por vários antígenos imunogênicos.

A resposta imune humoral induzida pela mesma combinação dos antígenos (AMA1, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β) administrada em camundongos C57BL/6 na

presença dos adjuvantes Quil A e Poly (I:C) foi avaliada recentemente em nosso laboratório. A co-administração dos 3 antígenos foi capaz de gerar altos títulos de anticorpos IgG específicos contra cada uma das proteínas na presença de ambos os adjuvantes, evidenciando a vantagem em induzir resposta imune contra 3 antígenos ao mesmo tempo utilizando-se uma única formulação (Pereira, 2012).

No presente estudo observamos que houve diminuição na resposta de anticorpo IgG pela combinação das 3 proteínas recombinantes emulsificadas em AIF, contra AMA1 e MSP1₁₉ ($p < 0,001$, em ambos). Porém o mesmo efeito não foi observado pela combinação emulsificada em Poly (I:C), o que pode ser considerada uma vantagem na geração da resposta imune. Interessantemente, Pereira observou um efeito prejudicial da combinação das proteínas recombinantes emulsificadas em Poly (I:C) na resposta de anticorpos contra AMA1 ($p < 0,001$) e MSP1₁₉ ($p < 0,001$) em BALB/c. Porém quando avaliou-se a linhagem C57BL/6, esse efeito não foi visualizado e curiosamente, a resposta induzida pela co-administração favoreceu a produção de anticorpos contra MSP3 β quando comparada com a proteína administrada isoladamente ($P < 0,01$). No mesmo trabalho, foi avaliada a co-administração dos 3 antígenos na presença de Quil A. Os resultados em camundongos BALB/c mostraram diminuição da resposta de anticorpos apenas contra MSP1₁₉ ($p < 0,001$) e em C57BL/6 não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Pereira, 2012).

Nesse mesmo contexto, em seu estudo da capacidade de geração de resposta humoral pela proteína quimérica, AMA-MSP1₁₉, Rocha, verificou que a resposta de anticorpos contra a MSP1₁₉ foi comprometida pelo uso combinado da mistura dos 2 antígenos (AMA1 e MSP1₁₉) administrados em camundongos BALB/c

no mesmo adjuvante, sem interferir na resposta contra AMA1. Por outro lado, esse efeito foi revertido pela imunização com a proteína de fusão (Rocha, 2012). Porém nenhum desses efeitos foi observado na linhagem C57BL/6. Frente a esses resultados, concluímos que a resposta humoral contra a proteína MSP1₁₉ pode ser prejudicada quando feita a combinação deste antígeno com AMA1, e que esse efeito é dependente do *background* genético do camundongo. Portanto, nossos dados demonstram que a utilização de múltiplos antígenos fusionados, ou co-administrados, pode ser uma estratégia promissora de vacinação contra a malária.

6. Conclusões

As proteínas recombinantes AMA1, MSP1₁₉, MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β , foram obtidas com sucesso, em bom nível de pureza;

Dentre os ensaios utilizados para a avaliação da resposta celular dos camundongos imunizados com a combinação dos três antígenos, o ELISPOT foi o que mostrou-se mais sensível;

Na presença do adjuvante Poly (I:C), a imunização com os três antígenos recombinantes, foi capaz de induzir a secreção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos C57BL/6 após estímulo *in vitro* com as proteínas AMA1, MSP1₁₉ e MSP1₁₉-PADRE de maneira semelhante aos antígenos administrados isoladamente.

A imunização de duas linhagens de camundongos (C57BL/6 e BALB/c), com uma nova proteína recombinante quimérica AMA1-MSP1₁₉ foi capaz de induzir a secreção de IFN- γ por células esplênicas após re-estimulação com as proteínas AMA-1 e MSP1₁₉;

Dentre os resultados obtidos, a resposta imune celular contra proteína AMA1 mostrou-se mais específica possivelmente pelo fato de ter sido obtida a partir de leveduras *P. pastoris*, apresentando menos contaminantes em comparação as proteínas MSP1₁₉-PADRE e MSP3 β , expressas em *E. coli*.

Em conjunto, nossos dados demonstram que a utilização de múltiplos antígenos fusionados, ou co-administrados, pode ser uma estratégia promissora de vacinação contra a malária.

7. Bibliografia

Agnandji ST, Lell B, Soulanoudjingar SS, Fernandes JF, Abossolo BP et al. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. **N Engl J Med.** v. 365, n. 20, p. 1863-1875, 2011.

Ahlborg N, Haddad D, Siddique AB, Roussilhon C, Rogier C, Trape JF, Troye-Blomberg M, Berzins K. Antibody responses to the repetitive *Plasmodium falciparum* antigen P332 in humans naturally primed to the parasite. **Clin Exp Immunol.** v. 129, n. 2, p. 318-25, 2002.

de Alencar BC, Persechini PM, Haolla FA, de Oliveira G, Silverio JC, Lannes-Vieira J, Machado AV, Gazzinelli RT, Bruna-Romero O, Rodrigues MM. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. **Infect Immun.** v. 77, n. 10, p. 4383-95, 2009.

Alexander J, Sidney J, Southwood S, Ruppert J, Oseroff C, Maewal A, Snoke K, Serra HM, Kubo RT, Sette A, et al. Development of high potency universal DR-restricted helper epitopes by modification of high affinity DR-blocking peptides. **Immunity.** v. 1, n. 9, p. 751-61, 1994.

Alexandre MA, Ferreira CO, Siqueira AM, Magalhães BL, Mourão MP, Lacerda MV, Alecrim MD. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis.** v. 16, n. 10, p. 1611-4, 2010.

Alves C, Toralles MB, Carvalho GC. HLA class II polymorphism in patients with type 1 diabetes mellitus from a Brazilian racially admixed population. **Ethn Dis.** v. 19, n. 4, p. 420-4, 2009.

Amino R, Thiberge S, Shorte S, Frischknecht F, Ménard R. Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. **C R Biol.** v. 329, n. 11, p. 858-862, 2006.

Anders RF, Crewther PE, Edwards S, Margetts M, Matthew ML, Pollock B, Pye D. Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*. **Vaccine.** v 16 n. 3, p. 240-7, 1998.

Arévalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* malaria vaccine development. **Mol Immunol.** v. 38, n. 6, p. 443-455, 2001.

Arévalo-Herrera M, Chitnis C, Herrera S. Current status of *Plasmodium vivax* vaccine. **Hum Vaccin.** v. 6, n. 1, p. 124-132, 2010.

Bang G, Prieur E, Roussilhon C, Druilhe P. Pre-clinical assessment of novel multivalent MSP3 malaria vaccine constructs. **PLoS One.** v. 6, n. 12, 2011.

Bargieri DY, Rosa DS, Braga CJ, Carvalho BO, Costa FT, Espíndola NM, Vaz AJ, Soares IS, Ferreira LC, Rodrigues MM. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella typhimurium* FliC flagellin. **Vaccine.** v. 26, n. 48, p. 6132-42, 2008.

Biswas S, Spencer AJ, Forbes EK, Gilbert SC, Holder AA, Hill AV, Draper SJ. Recombinant viral-vectored vaccines expressing *Plasmodium chabaudi* AS apical membrane antigen 1: mechanisms of vaccine-induced blood-stage protection. **J Immunol.** v. 188, n.10, p. 5041-53, 2012.

Bitencourt AR, Vicentin EC, Jimenez MC, Ricci R, Leite JA, Costa FT, Ferreira LC, Russell B, Nosten F, Rénia L, Galinski MR, Barnwell JW, Rodrigues MM, Soares IS. Antigenicity and immunogenicity of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3. **PLoS One.** v. 8, n. 2, 2013.

Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **J. Exped. Med.** v.172, p. 379-82, 1990.

Bouillet LÉ, Dias MO, Dorigo NA, Moura AD, Russell B, Nosten F, Renia L, Braga EM, Gazzinelli RT, Rodrigues MM, Soares IS, Bruna-Romero O. Long-term humoral and cellular immune responses elicited by a heterologous *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 protein prime/adenovirus boost immunization protocol. **Infect Immun.** v. 79, n. 9, p. 3642-52, 2011.

Burns JM Jr, Flaherty PR, Romero MM, Weidanz WP. Immunization against *Plasmodium chabaudi* using combined formulations of apical membrane antigen-1 and merozoite surface protein-1. **Vaccine.** V. 21, p. 1843-1852, 2002.

Burns JM Jr, Flaherty PR, Romero MM, Weidanz WP. Immunization against *Plasmodium chabaudi* malaria using combined formulations of apical membrane antigen-1 and merozoite surface protein-1. **Vaccine.** v. 21, n. 17-18, p. 1843-52, 2003.

Butler D. Mosquitoes score in chemical war. **Nature**. v. 475, n. 7354, 2011.

Carlton JM, Sina BJ, Adams JH. Why is *Plasmodium vivax* a neglected tropical disease? **PLoS Negl Trop Dis**. v. 5, n. 6, 2011.

Cheesman S, Raza A, Carter R. Mixed strain infections and strain-specific protective immunity in the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi chabaudi* in mice. **Infect Immun**. v. 74, n. 5, p. 2996-3001, 2006.

Chitarra V, Holm I, Bentley GA, Petres S, Longacre S. The crystal structure of C-terminal merozoite surface protein 1 at 1.8 Å resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. **Mol Cell**. v.3, p.457-464, 1999.

Collins WE, Jeffery GM, Roberts JM. A retrospective examination of reinfection of humans with *Plasmodium vivax*. **Am J Trop Med Hyg**. v. 70, n. 6, p. 642-4, 2004.

Costa FT, Lopes SC, Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, Russell B, Renia L, Marinho CR, Lacerda MV. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: perspectives from the Brazilian field. **Int J Parasitol**. v. 42, n. 12, p. 1099-105, 2012.

Culleton RL, Inoue M, Reece SE, Cheesman S, Carter R. Strain-specific immunity induced by immunization with pre-erythrocytic stages of *Plasmodium chabaudi*. **Parasite Immunol**. v. 33, n 1, p. 73-8, 2011.

Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine** v. 20, p. 385-396, 2002.

Cunha MG. Resposta imune humana contra proteínas recombinantes correspondentes a antígenos de superfície do merozoíta de *Plasmodium vivax*: ênfase ao desenvolvimento de uma vacina contra malária. Tese de doutorado, departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2001.

Doolan DL, Martinez-Alier N. Immune response to pre-erythrocytic stages of malaria parasites. **Curr Mol Med**. v. 6, n. 2, p. 169-85, 2006.

Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 22, n.1, p. 13-36, 2009.

Douglas NM, Anstey NM, Buffet PA, Poespoprodjo JR, Yeo TW, White NJ, Price RN. The anaemia of *Plasmodium vivax* malaria. **Malar J.** v. 11, n. 135, 2012.

Dutta S, Sullivan JS, Grady KK, Haynes JD, Komisar J, Batchelor AH, Soisson L, Diggs CL, Heppner DG, Lanar DE, Collins WE, Barnwell JW. High antibody titer against apical membrane antigen-1 is required to protect against malaria in the *Aotus* model. **PLoS One.** v. 4, n.12, 2009.

Ellis RD, Wu Y, Martin LB, Shaffer D, Miura K, Aebig J, Orcutt A, Rausch K, Zhu D, Mogensen A, Fay MP, Narum DL, Long C, Miller L, Durbin AP. Phase 1 study in malaria naïve adults of BSAM2/Alhydrogel®+CPG 7909, a blood stage vaccine against *P. falciparum* malaria. **PLoS One.**v. 7, n. 10, 2012.

Faber BW, Remarque EJ, Morgan WD, Kocken CH, Holder AA, Thomas AW. Malaria vaccine-related benefits of a single protein comprising *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 domains I and II fused to a modified form of the 19-kilodalton C-terminal fragment of merozoite surface protein 1. **Infect Immun.** v. 75, n. 12, p. 5947-55, 2007.

Finney OC, Riley EM, Walther M. Regulatory T cell in malaria-Friend or foe? **Trends in Immunol.** v. 31, n. 2, p. 63-70, 2010.

Galinski MR, Corredor-Medina C, Pova M, Crosby J, Ingravallo P, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in an alanine-rich central domain. **Mol Biochem Parasitol.** v.101, p. 131-147, 1999.

Galinski MR, Ingravallo P, Corredor-Medina C, Al-Khedery B, Pova M, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* merozoite surface proteins-3 β and -3 γ share structural similarities with *P. vivax* merozoite surface protein-3 α and define a new gene family. **Mol Biochem Parasitol.** v.115, p. 41-53, 2001.

Galinski MR, Barnwell, JW. *Plasmodium vivax*, who cares? **Malar J.** v. 11, n. 7, Suppl 1:S9, 2008.

Garcia LS. Malaria. **Clin Lab Med.** v. 30, n. 1, p. 93-129, 2010.

Gentil F, Bargieri DY, Leite JA, Franoso KS, Patricio MBM, Espindola NM, Vaz AJ, Palatnik-De-Sousa CB, Rodrigues MM, Costa FT, Soares IS. A recombinant vaccine based on domain II of *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1 induces high antibody titres in mice. **Vaccine** v. 28, p. 6183-6190, 2010.

Genton B, Al-Yaman F, Betuela I, Anders RF, Saul A, Baea K, Mellombo M, Taraika J, Brown GV, Pye D, Irving DO, Felger I, Beck HP, Smith TA, Alpers MP. Safety and immunogenicity of a three-component blood-stage malaria vaccine (MSP1, MSP2, RESA) against *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinean children. **Vaccine**. v. 22, n.1, p. 30-41, 2003.

Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, Franke-Fayard B, Janse CJ, Ménard R, Amino R Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 107, n. 43, p.18640-5, 2010.

Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunol Rev**. v. 240, n. 1, p. 297-316, 2011.

Healer J, Crawford S, Ralph S, McFadden G, Cowman AF. Independent translocation of two micronemal proteins in developing *Plasmodium falciparum* merozoites. **Infect Immun**. v. 70, n. 10, p.5751-5758, 2002.

Herrera S, Fernández OL, Vera O, Cárdenas W, Ramírez O, Palacios R, Chen-Mok M, Corradin G, Arévalo-Herrera M Phase I safety and immunogenicity trial of *Plasmodium vivax* CS derived long synthetic peptides adjuvanted with montanide ISA 720 or montanide ISA 51. **Am J Trop Med Hyg**. v. 84, n. 2, p. 12-20, 2011.

Hill AV. Vaccines against malaria. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. v. 366, n. 1579, p. 2806-2814, 2011.

Hisaeda H, Saul A, Reece JJ, Kennedy MC, Long CA, Miller LH, Stowers AW. Merozoite surface protein 3 and protection against malaria in *Aotus nancymai* monkeys. **J Infect Dis**. v. 185, n. 5, p. 657-64, 2002.

Hobbs C, Duffy P. Drugs for malaria: something old, something new, something borrowed. **F1000 Biol Rep**. v. 3, n. 24, 2011.

Hodder AN, Crewther PE, Matthew MI, Reid GE, Moritz RI, Simpson RJ, Anders RF. The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. **J Biol Chem.** v.271, n. 46, p. 29446-29452, 1996.

Hodder AN, Crewther PE, Anders RF. Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen1. **Infect Immun.** v. 69, n. 5, p. 3286-94, 2001.

Holder AA, Freeman RR. Byosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. **Exp Med J.** v.156, p. 1528-1538, 1982.

Holder AA. The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria. **Parasitology.** v. 136, n.12, p. 1445-1456, 2009.

Hulden L, Hulden L. Activation of the hypnozoite: a part of *Plasmodium vivax* life cycle and survival. **Malar J.** v.10, n. 90, 2011.

Jimenez MC. Estudos biofísicos, estruturais e imunológicos de proteínas recombinantes correspondentes a antígenos de superfície de merozoítas de *Plasmodium vivax*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Farmácia- Área de Análises Clínicas, 2007.

Jimenez MCS, Ramos CH, Barbosa JAG, Galinski M, Barnwell JW, Rodrigues MM, Soares IS. Biophysical characterization of the recombinant merozoite surface protein-3 of *Plasmodium vivax*. **Biochim et Biophys Acta.** v. 1780, p. 983-988, 2008.

Lee KS, Cox-Singh J, Singh B. Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally acquired human infections. **Malar J.** v. 8, n.73, 2009.

Lin E, Kiniboro B, Gray L, Dobbie S, Robinson L, Laumaea A, Schöpflin S, Stanisic D, Betuela I, Blood-Zikursh M, Siba P, Felger I, Schofield L, Zimmerman P, Mueller I. Differential patterns of infection and disease with *P. falciparum* and *P. vivax* in young Papua New Guinean children. **PLoS One.** v. 5, n. 2, 2010.

Lyke KE, Daou M, Diarra I, Kone A, Kouriba B, Thera MA, Dutta S, Lanar DE, Heppner DG Jr, Doumbo OK, Plowe CV, Sztein MB. Cell-mediated immunity

elicited by the blood stage malaria vaccine apical membrane antigen 1 in Malian adults: results of a Phase I randomized trial. **Vaccine**. v. 27, n.15, p. 2171-6, 2009.

Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **J Immunol Methods**. v.171, n.1., p.131-137, 1994.

Lusingu JP, Gesase S, Msham S, Francis F, Lemnge M, Seth M, Sembuche S, Rutta A, Minja D, Segeja MD, Bosomprah S, Cousens S, Noor R, Chilengi R, Druilhe P. Satisfactory safety and immunogenicity of MSP3 malaria vaccine candidate in Tanzanian children aged 12-24 months. **Malar J**. v. 8, n. 163, 2009.

malERA Consultative Group on Vaccines. A research agenda for malaria eradication: vaccines. **PLoS Med**. v. 8, n. 1, e1000398, 2011.

Mamo H, Esen M, Ajua A, Theisen M, Mordmüller B, Petros B. Humoral immune response to *Plasmodium falciparum* vaccine candidate GMZ2 and its components in populations naturally exposed to seasonal malaria in Ethiopia. **Malar J**. v. 12, n.51, 2013.

Michon P, Cole-Tobian JL, Dabod E, Schoepflin S, Igu J, Susapu M, Tarongka N, Zimmerman PA, Reeder JC, Beeson JG, Schofield L, King CL, Mueller I. The risk of malarial infections and disease in Papua New Guinean children. **Am J Trop Med Hyg**. v. 76, n. 6, p. 997-1008, 2007.

Miller LH, Saul A, Mahanty S. Revisiting Freund's incomplete adjuvant for vaccines in the developing world. **Trends Parasitol**. v. 21, n. 9, p. 412-4, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Malária no Brasil**, 2009. <http://portal.saude.gov.br/saude>. (Acessado em 13 de abril de 2010).

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**, 2ª edição, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Ações reduzem em 31% o número de casos de Malária no Brasil, 2011**. <http://portalsaude.saude.gov.br/> (Acessado em 15 de janeiro de 2012)

Mitchell GH, Thomas AW, Margos G, Dluzewski AR, Bannister LH. Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. **Infect and Immun.** v. 72, n.1, p. 154-158, 2004.

Miyaji EN, Carvalho E, Oliveira ML, Raw I, Ho PL. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. **Braz J Med Biol Res.** v. 44, n.6, p.500-513, 2011.

Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Rodrigues MM, Zavala F. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. **J Immunol Methods.** v. 181, n. 1, p. 45-54, 1995.

Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettli AU, Braga EM. Antibodies to *Plasmodium vivax* apical membrane antigen 1: Persistence and correlation with malaria transmission intensity. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 75, p. 582-587, 2006.

Mueller I, Galinski MR, Baird JK, Carlton JM, Kochar DK, Alonso PL, Del Portillo HA. Key gaps in knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **Lancet. Infect. Dis.** v.9, p. 555-566, 2009.

Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. **Adv Parasitol.** v. 81, p. 77-131, 2013.

Múfalo BC, Gentil F, Bargieri BY, Costa FTM, Rofrigues MM, Soares IS. *Plasmodium vivax* apical antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes and Infection,** v. 10, p. 1266-1273, 2008.

Noulin F, Borlon C, Van Den Abbeele J, D'Alessandro U, Erhart A. 1912-2012: a century of research on *Plasmodium vivax in vitro* culture. **Trends Parasitol.** v. 29, n. 6, p. 286-94, 2013.

Nussenzweig RS, Vanderberg J, Most H, Orton C. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. **Nature.** v. 216, n. 5111, p. 160-162, 1967.

Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S. Clinical and molecular aspects of malaria fever. **Trends Parasitol.** v. 27, n. 10, p.442-9, 2011..

Okada H, Kalinski P, Ueda R, Hoji A, Kohanbash G, Donegan TE, Mintz AH, Engh JA, Bartlett DL, Brown CK, Zeh H, Holtzman MP, Reinhart TA, Whiteside TL, Butterfield LH, Hamilton RL, Potter DM, Pollack IF, Salazar AM, Lieberman FS. Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with α -type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. **J Clin Oncol.** v. 29, n. 3, p. 330-6, 2011.

Okitsu SL, Mueller MS, Amacker M, Vogel D, Westerfeld N, Robinson JA, Zurbriggen R, Pluschke G. Preclinical profiling of the immunogenicity of a two-component subunit malaria vaccine candidate based on virosome technology. **Hum Vaccin.** v. 4, n. 2, p. 106-14, 2008.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. **Malar J.** v. 30, n. 9, 2010.

Parakh A, Agarwal N, Aggarwal A, Aneja A. *Plasmodium vivax* malaria in children: uncommon manifestations. **Ann Trop Paediat.** v. 29, n.4, p. 253-256, 2009.

Park H, Adamson L, Ha T, Mullen K, Hagen SI, Nogueron A, Sylwester AW, Axthelm MK, Legasse A, Piatak M Jr, Lifson JD, McElrath JM, Picker LJ, Seder RA. Polyinosinic-polycytidylic acid is the most effective TLR adjuvant for SIV Gag protein-induced T cell responses in nonhuman primates. **J Immunol.** v. 190, n. 8, p. 4103-15, 2013.

Pereira, MO. Análise da resposta imune induzida pela imunização experimental com antígenos recombinantes de *Plasmodium vivax*. Dissertação de mestrado, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012.

Pizarro JC, Vulliez-LE Normand B, Chesne-Seck ML, Collins CR, Withers-Martinez C, Hackett F, Blackman MJ, Faber BW, Remarque EJ, Kocken CH, Thomas AW, Bentley GA. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science.** v. 308, n. 5720, p. 408-411, 2005.

Pinzón MA, Pineda JC, Rosso F, Shinci M, Bonilla-Abadía F *Plasmodium vivax* cerebral malaria complicated with venous sinus thrombosis in Colombia. **Asian Pac J Trop Med.** v. 6, p. 5, p. 413-5, 2013.

Raposo CC, Santos JB, dos Santos GM, Gonçalves Eda G, da Silva AR. *Plasmodium vivax* malaria: related factors to severity in the State of Maranhão, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 46, n. 1, p. 67-72, 2013.

Rey L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos**, 4ª edição, 2008.

Remarque EJ, Faber BW, Kocken CH, Thomas AW. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends Parasitol.** v. 24, n. 2, p. 74-84, 2007.

Ribeiro SP, Rosa DS, Fonseca SG, Mairena EC, Postól E, Oliveira SC, Guilherme L, Kalil J, Cunha-Neto E. A vaccine encoding conserved promiscuous HIV CD4 epitopes induces broad T cell responses in mice transgenic to multiple common HLA class II molecules. **PLoS One.** v. 5, n. 6, 2010.

Riley EM, Stewart VA. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. **Nat Med.** v. 19, n. 2, p.168-78, 2013.

Rocha MV, Francoso KS, Casale POA, Soares I S. A Novel Chimeric Recombinant Protein for Vaccine Development Against *Plasmodium vivax* Malaria. In: XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2012, São Paulo. XVII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2012.

Rodrigues MH, Cunha MG, Machado RI, Ferreira OC, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. **Malar J.** v. 2, p. 39-46, 2003.

Rodrigues MHC, Rodrigues KM, Oliveira TR, Comodo AN, Rodrigues MM, Kocken CH, Thomas AW, Soares IS. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **Int J Parasitol.** v. 35, n. 1, p. 85-92, 2005.

Rosa DS, Tzelepis F, Cunha MG, Soares IS, Rodrigues MM. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. **Immunol Lett.** v. 92, n. 3, p. 259-268, 2004.

Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F, Bargieri DY, Medeiros MA, Soares IS, Sidney J, Sette A, Kalil J, Mello LE, Cunha-Neto E, Rodrigues MM. Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). **Microbes Infect.** v. 8, n. 8, p. 2130-7, 2006.

Rosa DS, Ribeiro SP, Cunha-Neto E. CD4+ T cell epitope discovery and rational vaccine design. **Arch Immunol Ther Exp.** v. 58, n. 2, p. 121-30, 2010.

Rosenberg R, Wirtz RA, Schneider I, Burge R. An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v.84, n. 2, p. 209-212, 1990.

Russell B, Suwanarusk R, Borlon C, Costa FT, Chu CS, Rijken MJ, Sriprawat K, Warter L, Koh EG, Malleret B, Colin Y, Bertrand O, Adams JH, D'Alessandro U, Snounou G, Nosten F, Rénia L. A reliable ex vivo invasion assay of human reticulocytes by *Plasmodium vivax*. **Blood.** v. 118, n. 13, 2011.

Sabbatini P, Tsuji T, Ferran L, Ritter E, Sedrak C, Tuballes K, Jungbluth AA, Ritter G, Aghajanian C, Bell-McGuinn K, Hensley ML, Konner J, Tew W, Spriggs DR, Hoffman EW, Venhaus R, Pan L, Salazar AM, Diefenbach CM, Old LJ, Gnjjatic S. Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. **Clin Cancer Res.** v. 18, n. 23, p. 6497-508, 2012.

Sarkar S e Bhattacharya P. Cerebral malaria caused by *P. vivax* in adult subjects. **Indian J Crit Care Med.** v.12, p. 204-205, 2008.

Schuldt NJ, Amalfitano A. Malaria vaccines: focus on adenovirus based vectors. **Vaccine.** v. 30, n. 35, p. 5191-8, 2012

Silvie O, Franetich JF, Charrin S, Mueller MS, Siau A, Bodescot M, Rubinstein E, Hannoun L, Charoenvit Y, Kocken CH, Thom S Aw, Van Gemert GJ, Sauerwein Rw, Blackman MJ, Anders RF, Pluschke G, Mazier D. A Role for Apical Membrane Antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. **J Biol Chem.** v. 279, p. 9490-9496, 2004.

Singh B, Kim Sung L, Matusop A, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. **Lancet** v. 363, n. 9414 1017–1024, 2004.

Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. **Clin Microbiol Rev.** v. 26, n. 2, p. 165-84, 2013.

Sirima SB, Tiono AB, Ouédraogo A, Diarra A, Ouédraogo AL, Yaro JB, Ouédraogo E, Gansané A, Bougouma EC, Konaté AT, Kaboré Y, Traoré A, Chilengi R, Soulama I, Luty AJ, Druilhe P, Cousens S, Nébié I. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate MSP3 long synthetic peptide in 12-24 months-old Burkinabe children. **PLoS One** v. 26, n. 4, 2009.

Soares IS, Levitus G, Souza JM, Portillo HAD, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. **Infect. Immun.** v. 65, n. 5, p.1606-1614, 1997.

Soares IS, Barnwell JW, Ferreira MU, Gomes da Cunha M, Laurino JP, Castilho BA, Rodrigues MM. A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. **Mol Med.** v.5, p.459-470, 1999.

Soares IS, Rodrigues MM. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*. **Parasitology** v. 124, p. 237-246, 2002.

Spence PJ, Langhorne J. T cell control of malaria pathogenesis. **Curr Opin Immunol.** v. 24, n. 4, p. 444-8, 2012.

Stephens R, Albano FR, Quin S, Pascal BJ, Harrison V, Stockinger B, Kioussis D, Weltzien HU, Langhorne J. Malaria-specific transgenic CD4(+) T cells protect immunodeficient mice from lethal infection and demonstrate requirement for a protective threshold of antibody production for parasite clearance. **Blood.** v. 106, n. 5, p. 1676-84, 2005.

Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. **Nat Rev Immunol.** v.4, p.169-180, 2004.

Sturm A, Amino R, Van De Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**. v.313, n.5791, p.1287-1290, 2006.

Sun HX, Xie Y, Ye YP. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**. v. 27, n.12, p. 1787-96, 2009.

Targett GA, Greenwood BM. Malaria vaccines and their potential role in the elimination of malaria. **Malar J**. v. 7, Suppl 1:S10, 2008.

Tewari K, Flynn BJ, Boscardin SB, Kastenmueller K, Salazar AM, Anderson CA, Soundarapandian V, Ahumada A, Keler T, Hoffman SL, Nussenzweig MC, Steinman RM, Seder RA. Poly(I:C) is an effective adjuvant for antibody and multi-functional CD4+ T cell responses to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (CSP) and DEC-CSP in non human primates. **Vaccine**. v. 28, n. 45, p. 7256-66, 2010.

Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Laurens MB, Kone AK, Guindo AB, Traore K, Sissoko M, Diallo DA, Diarra I, Kouriba B, Daou M, Dolo A, Baby M, Sissoko MS, Sagara I, Niangaly A, Traore I, Olotu A, Godeaux O, Leach A, Dubois MC, Ballou WR, Cohen J, Thompson D, Dube T, Soisson L, Diggs CL, Takala SL, Lyke KE, House B, Lanar DE, Dutta S, Heppner DG, Plowe CV. Safety and immunogenicity of an AMA1 malaria vaccine in Malian Adults: results of a phase 1 randomized controlled trial. **PLoS One**. v. 3, n.1, 2008.

Thera MA, Doumbo OK, Coulibaly D, Laurens MB, Kone AK, Guindo AB, Traore K, Sissoko M, Diallo DA, Diarra I, Kouriba B, Daou M, Dolo A, Baby M, Sissoko MS, Sagara I, Niangaly A, Traore I, Olotu A, Godeaux O, Leach A, Dubois MC, Ballou WR, Cohen J, Thompson D, Dube T, Soisson L, Diggs CL, Takala SL, Lyke KE, House B, Lanar DE, Dutta S, Heppner DG, Plowe CV. Safety and immunogenicity of an AMA1 malaria vaccine in Malian children: results of a phase 1 randomized controlled trial. **PLoS One**. v. 5, n.2, 2010.

Trumpfheller C, Caskey M, Nchinda G, Longhi MP, Mizenina O, Huang Y, Schlesinger SJ, Colonna M, Steinman RM. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4+ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 105, n. 7. P. 2574-9, 2008.

Tsuji, M. A retrospective evaluation of the role of T cells in the development of malaria vaccine. **Exp Parasitol**. v. 126, n. 3, p. 421-425, 2009.

Vasconcelos JR, Dominguez MR, Araújo AF, Ersching J, Tararam CA, Bruna-Romero O, Rodrigues MM. Relevance of long-lived CD8(+) T effector memory cells for protective immunity elicited by heterologous prime-boost vaccination. **Front Immunol.** v. 3, n. 358, 2012.

Verdijk RM, Mutis T, Esendam B, Kamp J, Melief CJ, Brand A, Goulmy. Polyribonucleosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. **J Immunol.** v. 163, n. 1, p. 57-61, 1999.

Vicentin EC. Imunizações pré-clínicas contra a malária baseadas no Antígeno 1 de Membrana Apical (PvAMA1): teste de protocolos homólogos e heterólogos de indução e reforço utilizando DNA plasmidial e/ou proteína recombinante. Tese de doutorado. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012.

Vitoriano-Souza J, Moreira Nd, Teixeira-Carvalho A, Carneiro CM, Siqueira FA, Vieira PM, Giunchetti RC, Moura SA, Fujiwara RT, Melo MN, Reis AB. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. **PLoS One.** v. 7, n. 7, 2012.

White MT, Conteh L, Cibulskis R, Azra C, Ghani ZC. Abstract Costs and cost-effectiveness of malaria control interventions - a systematic review. **Malaria J.** v. 10, n. 337, 2011.

White, NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. **Clin Infect Dis.** v. 46 n. 2, p. 172-173, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Pesticides and their application:** For the control of vectors and pests of public health importance. 6ª edição, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **World Malaria Report.** Geneva, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **World Malaria Report.** Geneva, 2012.

Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoites trickled out the injection site. **Cell Microbiol.** v. 9, n. 5, p. 1215-1222, 2007.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança



Of.CIBio/0032011/FCF

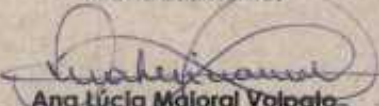
São Paulo, 25 de março de 2011

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, e de ordem do senhor Presidente da Comissão Interna de Biossegurança, informo a Vossa Senhoria que estamos aprovando "ad referendum" da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas o Projeto "Caracterização da resposta imune celular induzida pela imunização experimental com antígenos recombinantes de *Plasmodium vivax*".

Lembramos que, quando da elaboração do Relatório Anual a ser encaminhado à Comissão Interna de Biossegurança esta Comissão solicitará a V.Sa. comprovante de participação em treinamentos de Biossegurança de sua equipe para manutenção do credenciamento.

Atenciosamente,


Ana Lúcia Májoral Volpato
Membro da CIBio

Ilma. Sra.

Profa. Dra. **IRENE DA SILVA SOARES**

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP

NESTA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

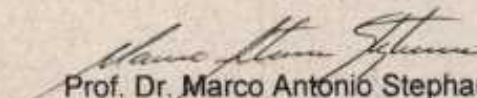
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/40/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "Caracterização da resposta imune celular induzida pela imunização experimental com antígenos recombinantes de *Plasmodium vivax*." (Protocolo CEUA/FCF/313), de responsabilidade da pesquisadora **Patricia Ostermayer Athayde Casale** sob a orientação da Profa. Dra. Irene da Silva Soares, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 04 de abril de 2011.

São Paulo, 07 de abril de 2011.


Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 660 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br