

Carlos Guillermo Quiroz Carrillo

AVALIAÇÃO, EM MODELOS DE PRIMATAS E MURINOS, DE
CANDIDATOS VACINAIS BASEADOS EM ANTÍGENOS
ERITROCITÁRIOS DE *Plasmodium vivax*

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial, para a obtenção do Grau de Doutor em Biotecnologia e Biociências Orientador: Prof. Dr. Oscar Bruna-Romero

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Carrillo, Carlos Guillermo Quirós
AVALIAÇÃO, EM MODELOS DE PRIMATAS E MURINOS, DE
CANDIDATOS VACINAIS BASEADOS EM ANTÍGENOS
ERITROCITÁRIOS DE *Plasmodium vivax* / Carlos
Guillermo Quirós Carrillo ; orientador, Oscar
Bruna-Romero. 2017.

141 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

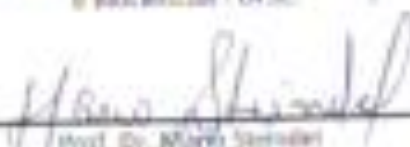
I. Biotecnologia e Biociências. 2. *Plasmodium
vivax*. 3. Vacinas recombinantes. 4. Adenovirus
humano tipo 5 recombinantes. 5. Proteínas
recombinantes. I. Bruna-Romero, Oscar. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III.
Título.

"Avaliação, em módulos de primatas e murinos, de candidatos vacantes baseados em antigênis intracitulares de *Plasmodium vivax*"

Por

Carlos Guillermo Quintas Carrillo

Terceira julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (19/PPG211C/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biofarmácia - UFSC.



Prof. Dr. Maria Strodler

Coordenadora(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biofarmácia

Banca examinadora



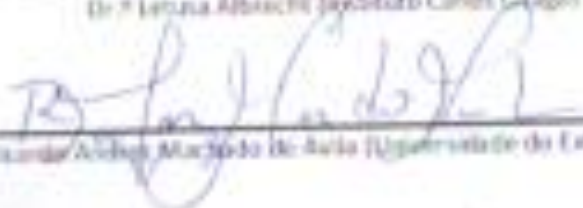
Dr. Oscar Bruno Bionero (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador



Dr. Isidoro Roque M. Oliveira (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Fabiana Albrecht (Instituto Carlos Chagas - FECTUC)



Dr. Ricardo Avelar Machado de Avelar (Universidade do Extremo Sul Catarinense)

Florianópolis, 27 de setembro de 2017.

Este trabalho é dedicado a Deus, aos meus amados pais, esposa e familiares que sempre me apoiam a todo momentos incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter preenchido minha vida de milhões de bênçãos, expressadas em alegria e tristeza, triunfo e frustração. Ele me colocou nesta aventura no outro extremo do continente fazem seis anos, obrigado por me outorgar a força suficiente para culminar este sonho.

Agradeço aos meus pais, Guillermo e Luz, a minha irmã, quase gêmea, Cynthia, por torcerem por mim sempre, ter me aguentado durante toda minha vida, sei que não foi fácil. Vocês são meus pilares, minha força e minha debilidade, lhes amo eternamente. Obrigado por ter me dado todo o apoio necessário a distância, sem vocês não poderia ter culminado esta aventura.

A minha esposa, amiga, cúmplice, Sâmela, por ter me incentivado e acompanhado nestes anos com grande paciência, companheirismo e compreensão. Você foi fundamental neste trabalho, cada peça neste projeto tem uma parte de você.

A meu Pedrinho, meu ninja, meu *Super Saiyajin*, que já está no último trecho do caminho. Cada momento de desespero, me mantém em pé em te imaginar, você é minha força e minha obra prima.

A meu avô Carlos, não conseguiria ter chegado até aqui sem teus ensinamentos de paciência, respeito e bons costumes.

A minha avó Esther, que está eternamente em meu coração, nas minhas orações e nos meus pensamentos, por ter torcido por mim sempre.

A minha querida família por torcerem por mim e estar sempre a meu lado mesmo à distância.

Aos meus amigos em Perú, em especial a Luigi, Walter, Fernando, Miguel, Diana, Raul e Sussan e meu camarada Juan Pablo, por torcer por mim e por me acompanhar. Estou eternamente grato pelo apoio e as forças outorgadas.

A meus ex companheiros do LVA, Clarissa, Lara, Naira, Lucas, Camila, Vane, Gis, Anne, Iza, vocês foram mais que amigos ou companheiros de

laboratório, vocês foram quase irmãos brasileiros, obrigado por toda a convivência e sabedoria me entregada.

A meus companheiros de laboratório, em especial a Sthefany, foi muito divertido e produtivo ter trabalhado com você, por todo o feedback outorgado. Você foi uma ótima amiga e companheira. Muito obrigado pela parceria!

E em especial, muito obrigado a meu orientador, Dr. Oscar Bruña Romero, por ter dividido seus conhecimentos e paciência em me orientar. Ser seu orientado foi o principal motivo que me atraiu a fazer o doutorado. E agora no final do caminho tenho certeza que foi a melhor decisão. Obrigado não só por ter sido meu orientador, senão por ter sido uma fonte de conhecimento, amizade e bons papos. Hasta la vista amigo!

*-“If I have seen further it is by standing on
the shoulders of giants.”*

Isaac Newton

RESUMO

Antígenos presentes na membrana dos merozoítos dos *Plasmodium spp.* são excelentes candidatos vacinais contra a malária, visto que muitas dessas proteínas são essenciais para a invasão dos eritrócitos hospedeiros. O desenvolvimento de uma vacina contra os estágios sanguíneos do parasito da malária, visa bloquear a ligação parasito-eritrócitos, a fim de diminuir ou eliminar os sintomas da doença. Esses sintomas, são resultantes da liberação das toxinas e dos compostos imunostimuladores após lises repetitivas dos eritrócitos infectados.

Neste estudo, foi avaliada a imunogenicidade e os níveis de proteção, após um desafio com os parasitos vivos do *Plasmodium vivax*, em macacos *Aotus lemurinus griseimembra*. O estímulo foi efetuado utilizando uma formulação vacinal experimental contendo quatro antígenos do estágio sanguíneo (Antígeno do merozoíto apical 1 -AMA1, Proteínas da superfície do merozoíto 1 -MSP-1, Proteína de ligação ao antígeno Duffy-DBP, Merozoite Apical Erythrocyte Binding-ligand -MAEBL) desse protozoário. Além disso, também avaliamos um novo candidato vacinal, denominado MAEBL, pertencente à mesma família de proteínas de ligação aos eritrócitos (EBLs) na tentativa de otimizar a formulação original da vacina.

Os resultados dos ensaios utilizando os macacos mostraram que a formulação vacinal contendo o AMA-1, MSP1₁₉ e as duas variantes da DBP-II formulada em adjuvante Montanide ISA720 é altamente imunogênica. Tal combinação de antígenos foi inoculada por via subcutânea sob a forma de proteínas (duas doses) e adenovírus (reforço final) recombinantes, obtendo-se o aumento sequencial dos anticorpos totais (até 1: 32000). Como resultado foi observado que os títulos de anticorpos foram intensamente impulsionados após o desafio com parasitos vivos. Os títulos de anticorpos por imunofluorescência também foram elevados (até 1:12000) e altamente específicos contra os merozoítos do *P. vivax* fixados em lâminas microscópicas. Quando examinamos as citocinas secretadas após as imunizações, foi observado o aumento das concentrações de IFN γ e IL-2 nos macacos imunizados. No entanto, nenhuma diferença significativa foi detectada durante as análises matemáticas. A parasitemia demonstrou que os macacos melhor imunizados apresentaram melhor proteção, com diminuição dos níveis máximos de parasitemia. Além disso, os macacos mostraram um encurtamento no período de infecção, o qual nunca ultrapassou os 18 dias nos animais imunizados, sendo patente até o dia 28 nos animais controle. Não foi possível obter proteção estéril com a formulação vacinal em teste.

Na tentativa de melhorar ainda mais a formulação vacinal, foi também estudado um novo antígeno denominado MAEBL, presente tanto no estágio hepático como no sanguíneo. Primeiro, foi efetuada uma análise *in silico* do gene putativo da proteína MAEBL em comparação com a sequência da MAEBL do *P. yoelii*, previamente publicada. O gene códon-otimizado para expressão em células eucarióticas, foi sintetizado e incorporado no genoma do vector adenoviral de tipo 5 humano deficiente de replicação. Testes iniciais de transcrição e tradução do RNA foram realizados indicando a correta produção do RNA mensageiro que codifica o transgene, bem como da proteína PvMAEBL recombinante. Camundongos C57BL/6 imunizados com este adenovírus foram parcialmente protegidos contra o desafio cruzado com os parasitos vivos de roedores *P. yoelii*, indicando não apenas que a vacina candidata é imunogênica, mas também que induz a proteção cruzada entre as duas espécies de *Plasmodium*.

Este estudo demonstrou que um candidato vacinal com capacidade para proteger parcialmente contra a malária de *P. vivax* foi gerado. Novos esforços estão sendo feitos para melhorar mais ainda esta formulação mediante a adição/troca de novas proteínas, incluindo MAEBL e/ou outros antígenos para realizar futuros testes de vacina contra *P. vivax*.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium vivax*, DBP, MAEBL, vacinas recombinantes, Dose-reforço, adenovírus humano tipo 5 recombinantes, proteínas recombinantes.

ABSTRACT

Antigens present on the membrane of *Plasmodium* spp. merozoites are excellent vaccine candidates against malaria because many of those proteins are required for invasion of host erythrocytes. Developing a vaccine against the blood stages of the malaria parasite aims at blocking this parasite-erythrocyte bond in order to decrease or eliminate the symptoms of the disease, which result from the release of toxins and immune-stimulating compounds after the repetitive burst of infected erythrocytes.

In this study we have evaluated, in twelve *Aotus lemurinus griseimembra* monkeys, the immunogenicity and the levels of protection elicited against a challenge with live *Plasmodium vivax* parasites induced by an experimental vaccine formulation containing four blood-stage antigens of this protozoan parasite. Additionally, we have also evaluated a new vaccine candidate, denominated MAEBL, belonging to the same family of erythrocyte-binding ligands (EBLs) in an attempt to optimize the original formulation of the vaccine.

Results of monkey experiments show that the vaccine formulation containing apical membrane antigen 1 (AMA-1), merozoite surface protein 1- 19KDa fragment- (MSP₁₉) and two variants of the Duffy-binding protein region II (DBP-II, PA and MT) formulated in Montanide ISA720 adjuvant is highly immunogenic. Total antibody titers increased sequentially (up to 1:32.000) as this combination of antigens were being inoculated subcutaneously in the form of recombinant proteins (two doses) or adenoviruses (final booster dose). Of interest, antibody titers were intensely boosted after the challenge with live parasites. Immunofluorescence antibody titers were also high (1:12.000) and highly specific against *P. vivax* merozoites fixed in microscopic slides. When we looked at the cytokines secreted after immunization, we could observe an increase of IFN γ and IL-2 concentrations in the supernatant of stimulated PBMCs from immunized monkeys. However, no statistical significance could be achieved during mathematical analyses. Parasitemia was also analyzed in all immunized animals after a challenge with live *P. vivax* parasites. The main fact observed was that the best immunized monkeys were better protected, as shown by a decrease in peak parasitemia levels as well as a decreased infection time, which never surpassed day 18 from onset in immunized animals, while it was patent up to day 28 in control animals. No sterile protection could be achieved with our vaccine formulation.

In an attempt to further improve our vaccine formulation, MAEBL, a new antigen present in both the liver and blood-stages was also studied. First, we analyzed *in silico* the putative gene of MAEBL by comparison with previously-published *P. yoelii* MAEBL sequences. A gene, codon-optimized for expression in eukaryotic cells, was synthesized and incorporated into type 5 replication-deficient adenoviral vector genome. Initial RNA-transcription and translation tests were carried out, indicating a correct production of both the messenger RNA encoding the transgene, as well as the recombinant Pv-MAEBL protein. C57BL/6 mice inoculated with 10exp8 plaque forming units of this viral vector were partially protected against a cross-challenge with live *P. yoelii* rodent parasites, indicating not only that the new vaccine candidate is immunogenic but also that it induces cross-protection between both *Plasmodium* species.

Our study demonstrated that we were able to generate a candidate vaccine formulation with capacity to partially protect against malaria, and we are devoting our efforts to further improve this formulation by the addition/exchange of new vaccine candidates, including MAEBL and/or other antigens to perform future *P. vivax* vaccine tests.

Key-words: Malaria, *Plasmodium vivax*, DBP, MAEBL, vaccines, recombinant, human adenoviruses type 5, recombinant proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial dos <i>Anopheles</i> , vetores de transmissão da malária.	24
Figura 2. Incidência da Malária no mundo causada pelo <i>P. falciparum</i> e <i>vivax</i> , os dois principais agentes etiológicos da malária.....	26
Figura 3. Ciclo biológico do <i>Plasmodium vivax</i>	28
Figura 4. Esquema do processo de interação do merozoíto do <i>P. vivax</i> com o eritrócito..	29
Figura 5. Resposta imune estimulada pelo <i>Plasmodium sp.</i>	31
Figura 6. Impacto dos candidatos vacinais no ciclo biológico do <i>P. vivax</i>	34
Figura 7. Esquema das proteínas PvDBP.	39
Figura 8. Representação da superfície molecular da DBL.....	40
Figura 9. Estrutura genética conservada da família de genes <i>eb1</i>	42
Figura 10. Esquema dos principais tipos de vacinas estudados.	44
Figura 11. Classificação convencional dos principais adjuvantes utilizados na atualidade.....	47
Figura 12. Esquema da estrutura do Adenovírus.	49
Figura 13. Esquema do genoma do Adenovírus humano.	50
Figura 14. Protocolo de imunizações utilizado para avaliar a capacidade imunogênica dos candidatos vacinais baseados nas proteínas PvDBP-II- MT e PA, AMA1 e MSP1 ₁₉	89
Figura 15. Título de anticorpos induzidos em cada indivíduo após administração dos candidatos vacinais através do tempo.	95
Figura 16. Valor médio dos títulos de anticorpos induzidos nos seis primatas <i>Aotus</i> imunizados.....	97
Figura 17. Títulos de anticorpos detectados por imunofluorescência observados em cada primata não humano após cada imunização com o protocolo PPAmix.	100
Figura 18. Cinética da capacidade dos anticorpos de reconhecer esquizontes eritrocitários.....	102
Figura 19. Análise da citocina IL-2 presente nos soros dos primatas imunizados e controle.....	104

Figura 20. Análise das citocinas [Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α), Th2 (IL-4 e IL-5), Treg (IL-10)] presentes nos soros dos primatas imunizados e controle.	105
Figura 21. Análises por ELISPOT das médias de spots de IFN- γ secretado pelas PBMC presentes nos primatas imunizados e controle.	107
Figura 22. Análise individual dos spots formados pelo IFN- γ secretado pelas PBMC presentes nos primatas imunizados e controle.	108
Figura 23. Análise individual das parasitemias atingidas nos primatas desafiados com o parasito <i>P. vivax</i> Sal-I.	109
Figura 24. Média dos valores de parasitemia atingidos nos primatas não humanos desafiados com o parasito <i>P. vivax</i> Sal-I.	110
Figura 25. Esquema da estrutura genética da sequência nucleotídica da PvMAEBL.	122
Figura 26. Esquema de imunização utilizado na avaliação do candidato vacinal formulado com a proteína PvMAEBL-M2.	125
Figura 27. Obtenção da sequência otimizada para sua expressão em células eucariotas do antígeno baseado na região M2 da proteína PvMAEBL.	126
Figura 28. Digestão do plasmídeo pBSK-MAEBL-Ad com as enzimas HindIII, BglII e Nar.	127
Figura 29. Digestão enzimática do plasmídeo de transferência pAdCMV-PvMAEBL-M2.	128
Figura 30. Análises da expressão das sequências proteicas em culturas de células HEK 293 por gel de PCR e por <i>Western Blot</i>	129
Figura 31. Imagens de <i>Western Blot</i> mostrando o padrão de bandas proteico do rHAdPvMAEBL-M2 expresso em células HEK293.	131
Figura 32. Análises de sobrevivência de Kaplan-Meier dos animais desafiados com <i>P. yoelii</i> YM dose letal.	132
Figura 33. Gráfico das médias das porcentagens de eritrócitos infectados nos animais desafiados com <i>P. yoelii</i> YM dose letal com respeito ao tempo.	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Candidatos vacinais contra malária vivax em desenvolvimento.....	33
Tabela 2. Candidatos vacinais contra malária em estágio clínico formulados com adenovírus recombinante.....	52
Tabela 3. Resumo qualitativo dos principais títulos obtidos nos ensaios ELISA, IFAT, CBA, ELISPOT (IFN- γ) e parasitemia acumulada ao final do desafio...	93
Tabela 4.-Título de anticorpos induzido após administração da formulação vacinal com os 4 antígenos AMA1, MSP1 ₁₉ , DBP-II-PA e DBP-II-MT.....	96
Tabela 5. Diferenças dos títulos de anticorpos induzidos após administração do protocolo PPAmix.	98
Tabela 6. Diferenças com respeito ao tempo das médias da capacidade de reconhecimento dos anticorpos estimulados.....	101
Tabela 7. Médias dos spots formados pelo IFN- γ secretado pelas PBMC em presença dos quatro antígenos isolados ou como mistura.....	106
Tabela 8. Valores das médias das parasitemias observadas nos primatas não humanos desde o dia do desafio até 36 dias depois.	111
Tabela 9. <i>Primers</i> utilizados para a verificação da identidade adenoviral do rHADMAEBL-M2.	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMA	Antígeno da membrana apical
APC	Células apresentadoras de antígenos
CBA	Arranjo citométrico por beads (<i>Cytometric Bead Array</i>)
DARC	Receptor do antígeno Duffy para quimiocinas
DBL	Domínio de ligação ao antígeno Duffy/DARC (Duffy-binding-like)
DBP	Proteína de ligação ao antígeno duffy (Duffy binding protein)
ELISA	Ensaio imunoabsorção ligado a enzima (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ELISPOT	Imunoensaio enzimático por pontos (“spots”)- (Enzyme-Linked ImmunoSpot)
HAd	Adenovírus humanos
IFAT	Título de anticorpo por imunofluorescência indireta
IPTG	Isopropil-1-tio- β -D-galactosídeo
LB	Luria-Bertani
MAEBL	Proteína apical do merozoíto ligante ao eritrócito (Merozoite Apical Erythrocyte Binding-ligand)
MSP	Proteínas de superfície dos merozoítos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PMBC	Células mononucleares do sangue periférico
PvDBP-II	Região II da proteína de ligação ao antígeno duffy
rHAd	Adenovírus humano recombinante
T amb	Temperatura ambiente
TRA	Antígenos ricos em triptofano

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
1.1 Malária.....	24
1.1.1 Malária aspectos gerais e distribuição geográfica.....	24
1.1.2 Ciclo biológico do <i>Plasmodium sp</i>	27
1.2 Respostas imunes contra Malária.....	30
1.3 Desenvolvimento de vacinas antimaláricas	32
1.3.1 Candidatos vacinais contra os antígenos sexuais	35
1.3.1.1 Pvs25 e Pvs28.....	35
1.3.1.2 Alanil aminopeptidase 1 (AnAPN1)	36
1.3.2 Candidatos vacinais contra o estágio pré-eritrocítico.....	36
1.3.2.1 Proteína do circunsporozoíto do <i>P. vivax</i> (PvCSP).....	36
1.3.2.2 Proteína de adesão ao trombospondina (TRAP)	37
1.3.3 Candidatos vacinais contra o estágio eritrocítico	37
1.3.3.1 <i>P. vivax</i> proteínas da superfície do merozoíto-1 (PvMSP-1)	37
1.3.3.2 Antígeno do merozoíto apical 1 do <i>P. vivax</i> (PvAMA1)	38
1.3.3.3 Região II da proteína de ligação ao antígeno Duffy do <i>P. vivax</i> (PvDBP-II).....	38
1.3.3.4 Merozoite Apical Erythrocyte Binding-ligand (MAEBL)	42
1.4 Tecnologias de vacinação	43
1.4.1 Proteínas recombinantes heterólogas	45
1.4.2 Adjuvantes.....	45
1.4.3 Adenovírus recombinantes.....	48
1.4.4 Protocolos de Dose-reforço ou Prime-boost	55
2 JUSTIFICATIVA.....	57
3 OBJETIVOS	59
3.1 Objetivo Geral.....	59
3.2 Objetivos específicos	59
CAPÍTULO II: Estudos com os principais antígenos da fase eritrocítica em primatas não humanos.....	87
1 APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO.....	88
2 MATERIAIS E MÉTODOS	88
2.1 Protocolos de imunizações dos primatas não humanos.....	88
2.2 Estudo das respostas imunes humorais estimuladas pelos candidatos vacinais	89
2.2.1 Detecção dos níveis de anticorpos específicos mediante ensaios de ELISA.....	90

2.2.2 Avaliação do potencial reativo dos anticorpos induzidos mediante ensaios de imunofluorescência.....	90
2.3 Triagem do perfil de citocinas estimulados pelos candidatos vacinais formulados com os principais antígenos da fase eritrocitária.....	91
2.3.1 Detecção de citocinas presentes no soro mediante Arranjo citométrico por contas (CBA)	91
2.3.2 Detecção do IFN- γ secretado pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) por teste Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT).....	92
2.4 Estudo <i>in vivo</i> da capacidade protetora do candidato vacinal baseado nos principais antígenos da fase eritrocítica da junção PvDBP-DARC	92
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
3.1 Avaliação dos níveis de resposta imune humoral estimulada após a imunização com os principais antígenos da fase eritrocitária	94
3.1.1 Quantificação por ELISA dos títulos de anticorpos IgG induzidos pelas diversas imunizações.....	94
3.1.2 Análises da capacidade de reconhecimento dos anticorpos sintetizados por IFAT.....	99
3.2 Triagem do perfil de citocinas estimulados pelos candidatos vacinais formulados com os principais antígenos da fase eritrocitária.....	103
3.2.1 Quantificação das citocinas estimuladas após as diversas imunizações e desafio mediante CBA.....	103
3.2.2 Quantificação do IFN- γ secretado pelas PBMC por intermédio de ELISPOT.....	106
3.3 Proteção induzida por imunização com a vacina experimental formulada com os quatro antígenos da fase eritrocitária administrados pelo sistema dose-reforço heterólogo.....	109
4 CONCLUSÕES.....	114

CAPÍTULO III: Construção de um candidato vacinal baseado da região M2 da proteína PvMAEBL..... 119

1 APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	121
2 MATERIAIS E MÉTODOS	121
2.1 Construção de um novo recombinante baseado da região M2 da proteína PvMAEBL.....	121
2.1.1 Sequência do antígeno PvMAEBL-M2 construída	121
2.1.2 Otimização da sequência codificante do antígeno PvMAEBL-M2 para sua expressão em células eucariotas.....	122
2.1.3 Construção do vetor adenoviral recombinante para o antígeno PvMAEBL-M2 e avaliação da expressão da proteína heteróloga.....	122

2.1.3.1 Geração do adenovírus recombinante com capacidade de expressão da proteína PvMAEBL-M2	122
2.1.3.2 Avaliação da expressão da proteína heteróloga pelo rHAdMAEBL-M2 em células HEK293.....	123
2.2 Determinar a capacidade de proteção cruzada do antígeno PvMAEBL-M2 administrado por rHAdMAEBL-M2 a camundongos C57BL/6.....	124
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
3.1 Construção do vetor adenoviral recombinante para o antígeno PvMAEBL-M2	126
3.1.1 Verificação dos rHAdMAEBL-M2 construídos nas células HEK293	128
3.1.2 Avaliação do reconhecimento das proteínas recombinantes expressadas nas células HEK293.....	130
3.2 Determinar a capacidade protetora dos candidatos vacinais em camundongos C57BL/6	131
4 CONCLUSÕES	135

**CAPÍTULO I:
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

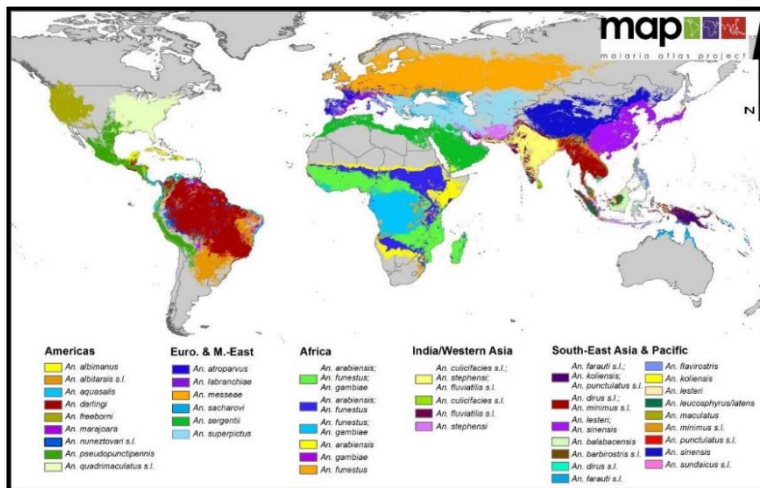
1.1 Malária

1.1.1 Malária aspectos gerais e distribuição geográfica

A malária é um problema de saúde mundial, que atinge principalmente os países tropicais e subtropicais. A malária é uma doença parasitária causada após infecção com o protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, Ordem Coccidiida, Sub-Ordem Haemosporidiidea, Família Plasmodiidae, Gênero *Plasmodium*. Na atualidade, das 150 espécies que identificadas neste gênero, cinco têm sido descritas como causadoras da malária humana (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*) (CARTER; MENDIS, 2002; KANTELE; JOKIRANTA, 2011). Tais protozoários diferenciam-se pela morfologia, o ciclo de vida e os sintomas que produzem nos seus hospedeiros.

Os agentes transmissores desta doença são as fêmeas dos mosquitos da ordem Diptera, da família Culicidae e do gênero *Anopheles*. No mundo existem aproximadamente 40 espécies de *Anopheles* com capacidade de transmitir a malária ao humano (HAY et al., 2010), sendo a mais distribuída no Brasil o *An. Darlingi* seguido de *An. Albitarsis* e *An. aquasalis* (SINKA et al., 2012) **Figura 1**.

Figura 1. Distribuição mundial dos *Anopheles*, vetores de transmissão da malária.



Fonte. (SINKA et al., 2012).

Dependendo do agente etiológico, a aparição dos sintomas é variável, podendo-se manifestar entre os sete dias no caso do *P. falciparum* (HILL, 2011) ou até em 30 dias no caso *P. malariae*, sendo os sintomas mais comuns:

- Febre;
- Calafrios;
- Suores;
- Dores de cabeça;
- Náusea e Vômito;
- Dores corporais;
- Mal-estar;
- Vertigem e anemia.

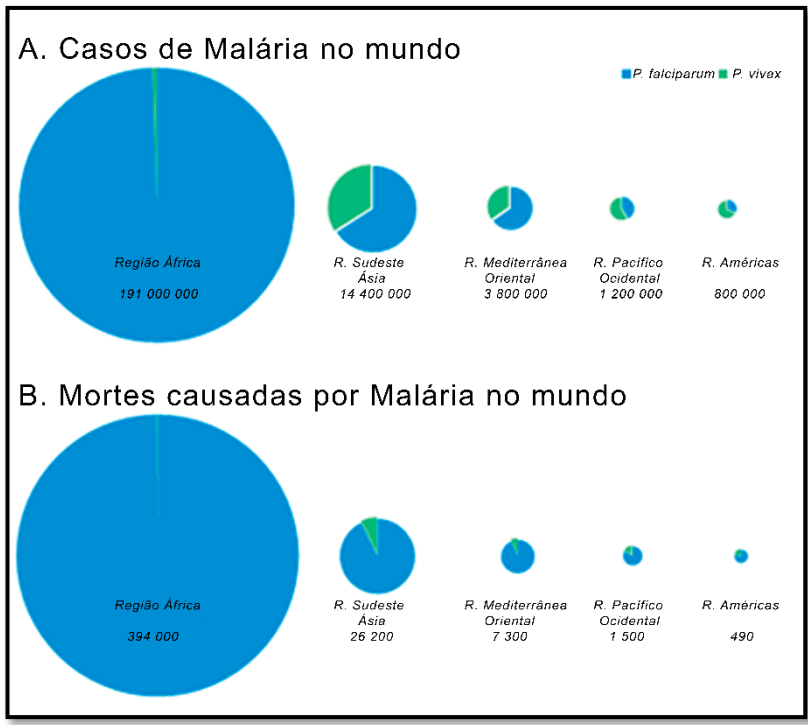
A Organização Mundial da Saúde (OMS) no seu último Relatório Mundial sobre a Malária relatou a incidência de aproximadamente 212 milhões de casos globais (OMS, 2016c), causados quase exclusivamente pelas espécies *P. falciparum* e *vivax*, resultando em 429 mil mortes no mundo. A **Figura 2** mostra os casos globais reportados no 2015 ocasionados pelos principais agentes etiológicos, *P. falciparum* (424710 mortes) e *P. vivax* (3100 mortes) (OMS, 2016c), sendo as crianças entre dois e dez anos (303000 mortes) as mais afetadas (OMS, 2016c).

Tais valores, representam um ponto final ao “Global Malaria Action Plan 2008-2015 (GMAP)”, e um de início à “Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030” (OMS, 2016b), proposto no ano 2015 pela Assembleia Mundial da Saúde em complemento ao plano “Action and Investment to Defeat Malaria 2016-2030 (AIM)” (OMS, 2016a). Tais planos expõem que é essencial o desenvolvimento de produtos capazes de controlar os vetores da doença, assim como o desenvolvimento de vacinas capazes de controlar os dois maiores agentes etiológicos (OMS, 2016a).

Historicamente, o desenvolvimento de vacinas contra a malária focou em combater o *P. falciparum*, principal causador da malária severa. No entanto, a segunda espécie mais prevalente no mundo, o *P. vivax*, considerada por muito tempo como uma espécie “benigna”, tem ganhado importância pelo incremento das evidências que demonstram que durante anos, os impactos econômicos, endêmicos e os sintomas causados por este parasito foram subestimados (PRICE et al., 2007). Neste contexto, segundo a última atualização do “The Malaria Vaccine Technology Roadmap”, é essencial o desenvolvimento tanto de uma vacina eficaz

contra o *P. falciparum* quanto contra *P. vivax* para alcançar a erradicação definitiva da doença (MALÁRIA VACCINE FUNDERS GROUP, 2013).

Figura 2. Incidência da Malária no mundo causada pelo *P. falciparum* e *vivax*, os dois principais agentes etiológicos da malária. (A) Casos reportados de Malária no mundo no ano 2015, apresentados segundo as diferentes regiões. (B) Mortes causadas por malária no mundo no 2015 divididas por regiões.



Fonte. Adaptado (OMS, 2016c).

1.1.2 Ciclo biológico do *Plasmodium vivax*

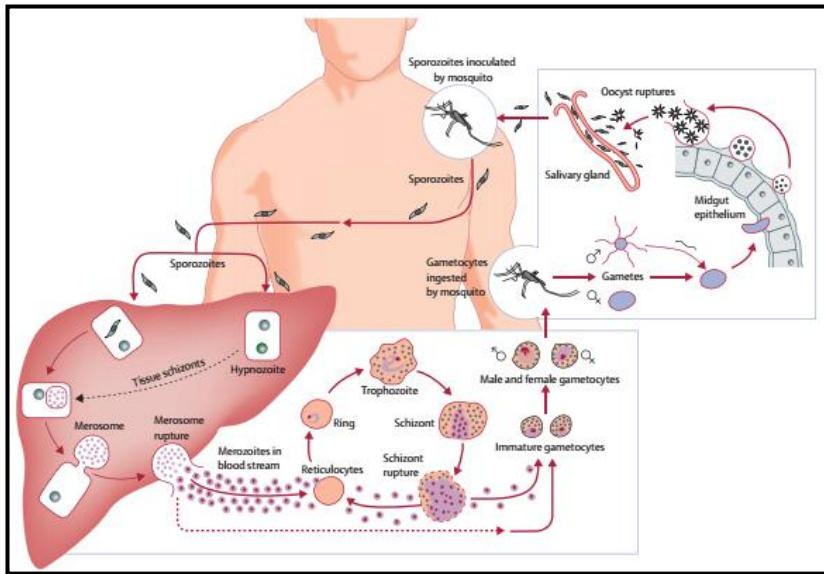
O ciclo biológico do *Plasmodium vivax* é semelhante aos ciclos dos outros *Plasmodium* sendo suas principais diferenças a capacidade de infectar unicamente reticulócitos, possuir a capacidade de se diferenciar em hipnozoítos e a presença de gametócitos durante os primeiros estágios no hospedeiro vertebrado.

Tais ciclos podem ser divididos em duas fases: Uma fase assexuada, que se desenvolve nos mamíferos e outra sexuada dentro das fêmeas do mosquito *Anopheles*.

A transmissão aos mamíferos acontece durante o repasto sanguíneo do mosquito. Naquele momento aproximadamente 15 esporozoítos (ROSENBERG et al., 1990) migram desde as glândulas salivares deste até o tecido subcutâneo do mamífero ou, em casos menos frequentes, diretamente na corrente sanguínea (SIDJANSKI; VANDERBERG, 1997). Uma vez em contato com os vasos sanguíneos, pela via direta ou por migração desde o local subcutâneo, estes esporozoítos migrarão rapidamente (de 30 minutos a 1 hora) (HAMILTON FAIRLEY, 1947) até os capilares sinusóides hepáticos. Neste lugar, após serem sequestrados, reconhecem e atravessam as células de Kupffer e invadem seus primeiros alvos, os hepatócitos, se iniciando o estágio hepático (PRADEL; FREVERT, 2001; MENARD, R. et al., 2013) como mostra a **Figura 3**. Nos hepatócitos, especificamente dentro do vacúolo parasitóforo (MOTA et al., 2001), os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos, os quais após sucessivas esquizogonias exoeritrocíticas, dão lugar aos esquizontes (estruturas compostas por numerosos merozoítos) (STURM et al., 2006). Porém, vários autores têm demonstrado que algumas espécies de *Plasmodium sp.* possuem a capacidade de pausar por semanas ou anos estas metamorfoses, se armazenando numa forma latente, denominada hipnozoíto, até serem reativados por mecanismos ainda desconhecidos (KROTOSKI et al., 1982; MARKUS, 2011; DOERIG et al., 2015).

Após dias de amadurecimento, brotamentos do hepatócito, denominados merossomos, liberarão nos capilares dos sinusóides (STURM et al., 2006) entre 30-40 mil esquizontes por cada esporozoíto diferenciado. Com este evento, finaliza o estágio hepático (DOERIG et al., 2015).

Figura 3. Ciclo biológico do *Plasmodium vivax*. O ciclo inicia após a inoculação de esporozoítos pela fêmea do mosquito anopheles. Depois, os esporozoítos viajam ao fígado, onde após sucessivas divisões assexuadas se diferenciam em merozoítos ou na forma dormente denominada hipnozoítos. Posteriormente, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea se iniciando o estágio eritrocítico. Durante este último estágio cada reticulócito infectado com o parasito libera ao meio novos merozoítos ou produtos tóxicos como hemozoína. Finalmente, uma porção de estes merozoítos sanguíneos se diferenciaram em gametócitos os quais serão ingeridos pelo mosquito após uma segunda picada culminando o ciclo biológico dentro do hospedeiro vertebrado.

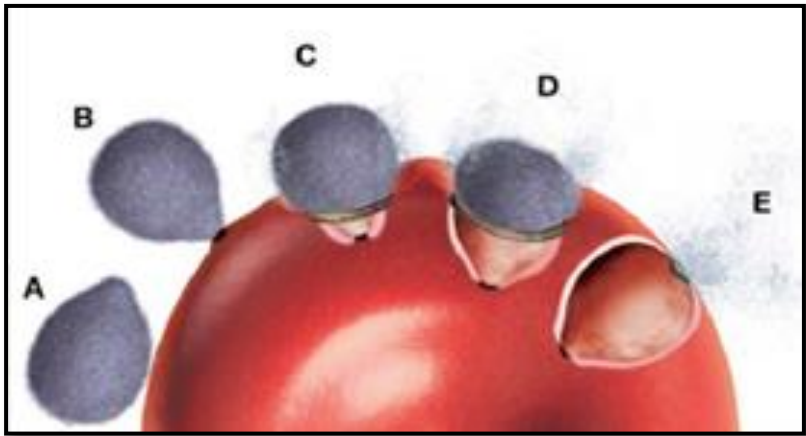


Fonte. (MUELLER et al., 2009).

No início do estágio eritrocítico, cada merozoíto liberado nos capilares dos sinusóides poderá invadir um eritrócito (HILL, 2006). Após sucessivas esquizogonias formará esquizontes eritrocíticos (compostos aproximadamente por 20 merozoítos). Por sua vez os merozoitos serão liberados depois de 48h, iniciando ciclos complexos repetitivos intra-eritrocíticos de invasão-multiplicação-lise-invasão em intervalos regulares.

A invasão dos eritrócitos alvo envolve uma complexa cascata de quatro passos: reorientação, adsorção, formação da junção irreversível e entrada, conforme mostrado na **Figura 4**.

Figura 4. Esquema do processo de interação do merozoíto do *P. vivax* com o eritrócito. (A) Reorientação; (B) Adsorção (C e D) troca do polo apical para o outro polo e junção por filamentos de actina-miosina do parasito; (E) processo em que uma protease denominada rombólíde atua para a entrada do parasito formando um vacúolo parasitóforo.



Fonte Adaptado de: (COWMAN; CRABB, 2006).

Sabe-se que as interações entre algumas das proteínas do parasito com as superfícies dos eritrócitos são fundamentais no reconhecimento dos eritrócitos alvo e no início da invasão. Os principais antígenos envolvidos nesse processo são as proteínas de superfície dos merozoítos (MSP-1, MSP-2 E MSP-3) e o antígeno 1 da membrana apical (AMA-1) (PREISER et al., 2000; COWMAN; CRABB, 2006).

Uma vez reconhecido o eritrócito alvo, o parasito precisa se reorientar, com auxílio do antígeno AMA-1, para possibilitar a formação de junções irreversíveis, produtos das interações secundárias entre o aparelho apical parasitário e a membrana do eritrócito (COWMAN; CRABB, 2006).

Após a formação de tais junções, e por fatores desconhecidos, se estimulam motores de actina-miosina, que produzem a migração das junções desde a extremidade anterior à posterior, e o decorrente ingresso do merozoíto para o interior do eritrócito. A etapa final da invasão consiste na selagem do vacúolo e da membrana eritrocitária formada.

Produto dos ciclos repetitivos, são liberados à corrente sanguínea, grupos heme, na forma de hemozoína, os quais são, dentre outros, responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. (DOERIG et al., 2015).

Após alguns ciclos, uma pequena fração dos merozoítos sanguíneos sofrem diferenciação em gametócitos masculinos e femininos. Estes ingressam ao mosquito numa segunda picada, e se diferenciam no intestino do invertebrado em macrogameta (feminino) e microgameta (masculino). O processo de fertilização acontece alguns minutos após ingestão pelo mosquito (WERNSDORFER, 1988), e origina inicialmente o zigoto, posteriormente oocinetos, oocistos e finalmente os novos esporozoítos, que serão armazenados nas glândulas salivares para infectar um novo hospedeiro vertebrado (DOERIG et al., 2015).

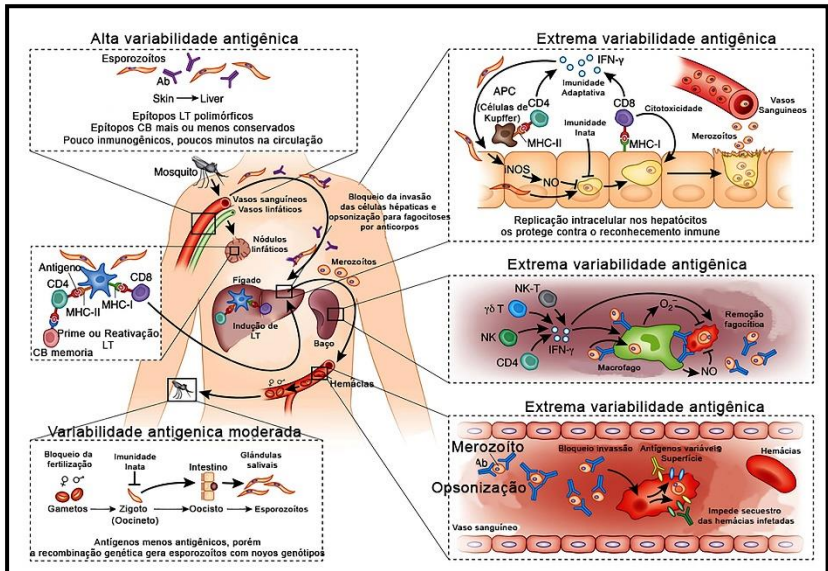
1.2 Respostas imunes contra Malária

As manifestações clínicas da doença nos humanos variam de acordo com o gênero de *Plasmodium spp.* Infectante e com características próprias do indivíduo, podendo ser assintomática, observado em indivíduos constantemente expostos à malária (ARÉVALO-HERRERA et al., 2014), moderada e grave no caso da maioria das invasões produzidas pelos parasitos *P. falciparum* (MILLER et al., 1977) e *P. vivax* (PRICE et al., 2009; GAMA et al., 2011).

Durante o périplo dos esporozoítos pela corrente sanguínea rumo ao fígado, alguns destes são reconhecidos pelas células apresentadoras de antígenos (APC), especialmente pelas células dendríticas, nos linfonodos, e apresentados às células CD8+T e CD4+T. Estas últimas estimulam as células B a produzir anticorpos específicos (RILEY; STEWART, 2013), iniciando-se as respostas imunes adquiridas contra a doença **Figura 5.**

Esses anticorpos, possivelmente por opsonização (DOOLAN; MARTINEZ-ALIER, 2006; KEBAIER et al., 2009), assim como as células CD8+T (SCHOFIELD et al., 1987; WEISS et al., 1988), produtoras da citocina IFN- γ (FERREIRA et al., 1986) e as células CD4+T (MARSH; KINYANJUI, 2006) exercem uma importante atividade protetora frente aos estágios pré-eritrocíticos.

Figura 5. Resposta imune estimulada pelo *Plasmodium sp.* Os esporozoítos recém inoculados migram rapidamente para os nódulos linfáticos, onde são apresentados aos linfócitos T ou B, ou para o fígado onde infetam aos hepatócitos, esse rápido movimento acreditasse é uma estratégia de evasão a opsonização por anticorpos. No fígado os esporozoítos são principalmente controlados pelo sistema imune celular ativada principalmente pela citocina IFN- γ . Finalmente, os parasitos sobreviventes, na forma de merozoítos, são liberados novamente à torrente sanguínea onde por opsonização ou fagocitoses são bloqueados.



Fonte. Adaptado de (RILEY; STEWART, 2013).

O estágio eritrocítico, se caracteriza pela liberação de produtos tóxicos no meio extracelular e pela ativação das células inflamatórias secretoras de citocinas responsáveis pelo início dos sintomas (HISAEDA et al., 2005). Este estágio tem como principal mecanismo de resposta imune a humoral, composta principalmente por anticorpos contra proteínas de ligação dos merozoítos aos eritrócitos, como foi observado nas populações expostas constantemente ao parasito (MICHON et al., 2000; SOUZA-SILVA et al., 2010; ZAKERI et al., 2011; KANO et al., 2012) nas quais os níveis de anticorpos aumentaram proporcionalmente com a idade (FRASER et al., 1997; MICHON et al., 1998), sugerindo algum tipo de reforço cepa-específico em cada novo quadro clínico.

A resposta imune durante a fase sexual, no interior do mosquito, é principalmente composta pelo sistema imune do hospedeiro não vertebrado (MICHEL; KAFATOS, 2005), assim como dos anticorpos presentes no sangue ingerido, e dos componentes do sistema complemento que se encontram ativos durante alguns minutos ou horas após a ingestão (RENER et al., 1980).

1.3 Desenvolvimento de vacinas antimaláricas

Nos últimos anos, a OMS em conjunto com diversos governos e entidades públicas e privadas vem promovendo diversas diretrizes para o uso de mosquiteiros, repelentes, inseticidas e educação às populações com o intuito de controlar e futuramente erradicar a malária no mundo. Lamentavelmente, tais recomendações têm sido insuficientes para neutralizar os efeitos do surgimento de mosquitos *Anopheles* resistentes aos principais inseticidas (CISSE et al., 2015), de parasitos resistentes aos tratamentos antimaláricos (SEVERINI; MENEGON, 2015), das constantes migrações humanas aos territórios endêmicos do parasito (BASURKO et al., 2013), e do deterioro sócio-econômico e da saúde (DABIRÉ et al., 2008; LUMSDEN et al., 2012). Face a este panorama o desenvolvimento de vacinas eficientes contra os *Plasmodium sp.* mais prevalentes a nível mundial aparece como uma eficaz alternativa.

Nos últimos anos, a procura por tais vacinas tem sido constante, mas infrutífera, possivelmente devido ao complexo ciclo de vida do parasito que apresenta em cada estágio um alto número de proteínas polimórficas, como mostra a Figura 5, as quais têm demonstrado ser responsáveis por alguns dos mecanismos de evasão do parasito ao sistema imune do hospedeiro (HISAEDA et al., 2005).

O desenvolvimento de imunidade em indivíduos em contato constante com a doença, assim como a proteção induzida em crianças pela transferência de soro proveniente de pacientes assintomáticos (SABCHAREON et al., 1991) encorajam à ideia de desenvolver uma vacina eficiente contra a malária. As características esperáveis de tal vacina contra a malária são um bom perfil de segurança juntamente com uma alta e duradoura eficácia contra a infecção e a doença.

Historicamente, as primeiras vacinais contra malária que mostraram capacidade protetora em camundongos (NUSSENZWEIG et al., 1967), primatas não humanos (COLLINS; CONTACOS, 1972) e primatas humanos (RIECKMANN et al., 1979) foram formuladas com esporozoítos atenuados por irradiação. Porém, tais candidatas vacinais não são uma estratégia prática, já que são necessários um alto número de parasitos atenuados que precisam ser obtidos mediante disseção de

mosquitos por não existir até hoje culturas *in vitro* disponíveis, nem segura, por ter uma virulência residual.

Com o advento da biologia molecular, novas formulações vacinais, contendo só as subunidades mais imunogênicas dos agentes etiológicos, foram estabelecidas. Tais candidatos têm a característica de poder apresentar os antígenos ao sistema imune do indivíduo desde formulações de DNA, proteínas ou glicoconjugados purificados, peptídeos sintéticos, ou vetores recombinantes (proteínas recombinantes, plasmídeos bacterianos, bactérias recombinantes ou vetores virais recombinantes) (RAPPUOLI & GROOT, 2004).

Embora os *P. vivax* e *falciparum* sejam as duas espécies responsáveis pelos maiores números de casos de malária no mundo, historicamente os grandes esforços têm sido dedicados quase exclusivamente à elaboração de uma vacina contra o *P. falciparum*, relatado como o único agente etiológico causador de malária severa durante anos.

Recentemente, tem sido relatado a adesividade do outrora parasito benigno, *P. vivax*. (CARVALHO et al., 2010). Baseado nesta observação assim como na sua capacidade de formar hipnozoítos (KROTOSKI et al., 1982), no aparecimento prematuro de gametócitos, ocasionado por menores ciclos de desenvolvimento nos vetores (MUELLER et al., 2009) e por sua capacidade de adaptação a diversos climas, que nos últimos anos tem acarretado a substituição do *P. falciparum* por esta espécie na região da África (WHO, 2014) é impreterível o desenvolvimento de uma vacina eficiente contra esta espécie.

Na atualidade são poucos os alvos vacinais contra o *P. vivax* comparados com os desenvolvidos contra o *P. falciparum*, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Candidatos vacinais contra malária vivax em desenvolvimento.

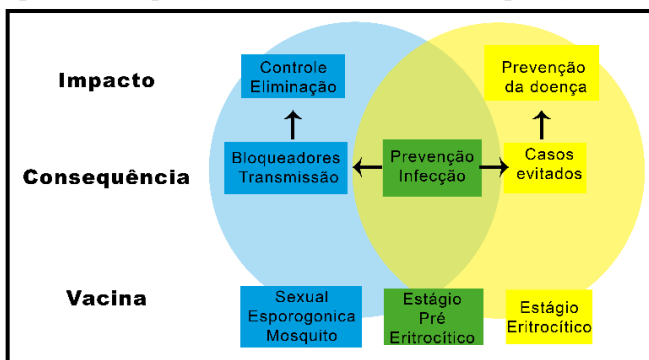
Candidato vacinal	Antígeno alvo	Estágio atingido
Pvs25H	Fase sexual	(MALKIN et al., 2005; WU et al., 2008).
Pvs28		(HISAEDA et al., 2000).
AnAPN1		(MATHIAS et al., 2012; ARMISTEAD et al., 2014)
VMP001, PvCSP-LSP (PvCSP)	Estagio pre eritrocítico	(HERRERA et al., 2011; VANLOUBBEECK et

		al., 2013; BENNETT et al., 2016)
ChAd63-PvTRAP/ MVA-PvTRAP		(BAUZA et al., 2014)
PvDBPII-DEK ^{null} , ChAd63-PvDBPII/ MVA- PvDBPII (PvDBP)	Estágio eritrocítico	(MORENO et al., 2008; NTUMNGIA; ADAMS, 2012; DE CASSAN et al., 2015)
PvMSP1 ₁₉		(DEVI et al., 2007)
PvAMA1, ChAd63- PvAMA1/ MVA-PvAMA1		(BOUILLET et al., 2011a; VICENTIN et al., 2014).

Fonte. Adaptado de:(MUELLER et al., 2015).

Tais candidatos, podem ser classificados de acordo com o estágio do ciclo da vida do parasito que buscam agir em 3 grupos: candidatos vacinais do estágio pré-eritrocítico, estágio eritrocítico ou sanguíneos e da fase sexual (BIRKETT et al., 2013) **Figura 6.**

Figura 6. Impacto dos candidatos vacinais no ciclo biológico do *P. vivax*. Os candidatos vacinais podem estar focados em três estágios do ciclo de vida do parasito: estagio sexual (focado no bloqueio da transmissão e por consequência na eliminação da doença), pre eritrocítico (focado na prevenção de novas infecções) e eritrocítico (focado em evitar novos casos e assim prevenir a aparição de sintomas e suas complicações).



Fonte. Adaptado de: (BIRKETT et al., 2013).

Estes grupos constituem parte de duas grandes estratégias: a primeira focada na prevenção da transmissão (vacinas contra a fase sexual), e a segunda focada na prevenção da infecção e aparição dos sintomas clínicos (vacinas contra o estágio pré-eritrocítico e o estágio eritrocítico). Sendo o ideal aqueles candidatos vacinais que interajam nas duas estratégias diretamente.

1.3.1 Candidatos vacinais contra os antígenos sexuais

O único grupo de candidatos vacinais focados no bloqueio da transmissão e diminuição dos parasitos e não em prevenir a doença, são aqueles que contam na sua formulação com antígenos da fase sexual, especialmente antígenos da superfície dos gametas, zigoto ou do oocineto.

Estes candidatos tem as vantagens de: (i) precisar combater pouco número de parasitos (aproximadamente 100 zigotos ou oocinetos), em comparação com os bilhões de parasitos presentes nos outros estágios, e (ii) que estes se encontram expostos durante horas de forma extracelular (KASLOW, 1997).

O bloqueio dos parasitos nesta fase, além de prevenir a doença, evitará o aparecimento de parasitos mutantes resistentes aos diversos componentes protetores, evitando finalmente a redução da morbidade e mortalidade (SMITH et al., 2001).

1.3.1.1 Pvs25 e Pvs28

Os antígenos Pvs25 (25 kDa), presente na superfície do zigoto e envolvido na invasão do oocineto ao intestino, e o Pvs28, presente na superfície do oocineto, são proteínas pouco polimórficas (TSUBOI et al., 1998). Estes candidatos vacinais pós-fertilização, têm sido formulados com Alhydrogel e testados em camundongos, nos quais foram capazes de estimular alta produção de anticorpos, evitando a transmissão ao mosquito (HISAEDA et al., 2000).

Estudos realizados com o candidato vacinal Pvs25H/Alhydrogel, contendo o antígeno heterólogo Pvs25H (20,5 kDa portador dos aminoácidos 23-195 da proteína Pvs25), em humanos demonstraram uma diminuição de apenas 20-30% do desenvolvimento do *P. vivax* nos mosquitos (MALKIN et al., 2005).

Estudos posteriores realizados em primatas não humanos do tipo rhesus, usando uma vacina formulada com a proteína recombinante Pvs25H em Montanide ISA720, estimularam maior quantidade de anticorpos inibitórios em comparação com o uso do Alhydrogel (SAUL et al., 2007; WU et al., 2008).

1.3.1.2 Alanil aminopeptidase 1 (AnAPN1)

A AnAPN1 é uma proteína altamente conservada em todas as espécies de *Plasmodium*. Esta proteína tem papel fundamental na invasão do oocineto ao intestino do mosquito, onde devem formar os oocistos que finalmente sofrem o processo de maturação até a fase de esporozoítos. Neste contexto, recentes estudos realizados em camundongos demonstraram uma potencial função inibitória dos anticorpos específicos estimulados contra AnAPN1 (MATHIAS et al., 2012), e o bloqueio da transmissão dos *P. vivax* e *falciparum* a diferentes *Anopheles* (ARMISTEAD et al., 2014)

1.3.2 Candidatos vacinais contra o estágio pré-eritrocítico

Os candidatos vacinais do estágio pré-eritrocítico têm como objetivos a neutralização dos esporozoítos inoculados e o bloqueio da invasão destes aos hepatócitos.

Ao inibir a infecção dos hepatócitos, é reduzido o potencial de diferenciação dos esporozoítos a merozoítos ou hipnozoítos, se evitando desta forma o início do ciclo de invasão-multiplicação-lise-invasão dos eritrócitos e a consequente gametogênese. Como foi descrito anteriormente, cada esporozoíto tem o potencial de produzir entre 30000 – 40000 merozoítos, pelo qual os candidatos vacinais do estágio pré-eritrocítico precisam ser altamente efetivos, toda vez que uma pequena quantidade de *P. vivax* sobrevivente que emerge do fígado pode ocasionar o desenvolvimento da doença.

Alguns dos antígenos estudados na fase pré-eritrocítica são:

1.3.2.1 Proteína do circunsporozoíto do *P. vivax* (PvCSP)

A proteína do circunsporozoíto tem uma função importante na invasão dos parasitos ao fígado, ao ser responsável da união dos esporozoítos com o receptor heparan sulfato dos hepatócitos (FREVERT et al., 1993; PRADEL et al., 2004). Tal proteína vem sendo utilizada como antígeno na formulação do candidato vacinal RTS,S, atualmente, o único candidato contra malária que culminou a fase 3 de desenvolvimento e está pronta para iniciar a fase 4 a início do 2018. Este candidato tem como alvo a proteína do circunsporozoíto do *P. falciparum* (PfCSP).

O último reporte sobre esta vacina mostra que ao final da fase 3 a vacina RTS,S/ AS01 preveniu 36,3% e 28,3% dos casos de malária nas crianças (5-17 meses de idade) imunizadas com 4 doses e 3 doses, respetivamente e 25,9% e 18,3% nos infantes (6-12 semanas) vacinados com os mesmos protocolos (RTS; SCTP, 2015).

Considerando a relevância desses resultados, foi construído em base aos extremos carboxi e amino terminal da PfCSP e das regiões repetitivas das proteínas VK210 e VK247, um candidato vacinal contra *P. vivax*, denominado Vivax malaria protein 1 (VMP001), o qual demonstrou em estudos de fase clínica 1/2a diminuir o tempo de parasitemia em 59% e gerar respostas humorais e celulares robustas (BENNETT et al., 2016).

1.3.2.2 Proteína de adesão ao trombospondina (TRAP)

O antígeno PvTRAP é uma proteína transmembrana importante na mobilidade e na invasão dos hepatócitos (EJIGIRI et al., 2012) e das glândulas salivais do mosquito (GHOSH et al., 2009). Candidatos vacinais formulados com tal antígeno e administrados com dois diferentes vetores, Adenovírus de chimpanzés (ChAd63) e Vaccínia vírus Ankara (MVA), estimularam a produção de altos títulos de anticorpos e de resposta de células T em camundongos (BAUZA et al., 2014). Mais recentemente, camundongos foram imunizados com pseudovírus (vírus like particles) portando o antígeno PvTRAP administrado em protocolo homólogo e posteriormente desafiado com *P. berghei* expressando a proteína PvTRAP. Tais camundongos apresentaram uma alta taxa de sobrevivência, provavelmente por consequência do aumento das respostas imunes humorais e celulares (CABRAL-MIRANDA et al., 2017).

1.3.3 Candidatos vacinais contra o estágio eritrocítico

Os candidatos contra este estágio têm o intuito de diminuir os sintomas típicos e severos ocasionados pela doença, e inibir a transmissão desta (BIRKETT et al., 2013). Para atingir tal fim, a maioria destes candidatos têm incorporado na sua formulação proteínas dos merozoítos participantes na invasão dos eritrócitos como podem ser as proteínas MSP-1,-3,-4 -5 e -9, RBP-5, AMA, DBP, MAEBL ou recentemente os antígenos ricos em triptofano (TRA) (ZEESHAN et al., 2013; ZEESHAN, MOHAMMAD et al., 2015; ZEESHAN, M. et al., 2015).

1.3.3.1 *P. vivax* proteínas da superfície do merozoíto-1 (PvMSP-1)

Durante a invasão aos eritrócitos jovens, reticulócitos, a proteína MSP-1 (200kDa) é subdividida inicialmente por clivagem proteolítica em 4 fragmentos denominados MSP-1₈₃, MSP-1₃₀, MSP-1₃₈ e MSP-1₄₂. Durante uma segunda clivagem o fragmento MSP-1₄₂, único ainda ancorado a membrana do merozoíto, é subdividido em diversos fragmentos solúveis, com exceção do fragmento MSP-1₁₉ (19kDa, que permanece

ligado à membrana do merozoíto pela união do seu extremo C-terminal com o fosfatidilinositol da membrana) (HOLDER; BLACKMAN, 1994). Este fragmento consiste de dois domínios de 5 cisteínas cada um, que em conjunto, compõem o fator de crescimento epidérmico, principal alvo de proteção (CALVO et al., 1996) como foi demonstrado em diversos estudos *in vitro e in vivo* (COLLINS et al., 1999; DUTTA et al., 2001; SACHDEVA et al., 2004; ROSA et al., 2006; SINGH et al., 2006; BARGIERI et al., 2008).

1.3.3.2 Antígeno do merozoíto apical 1 do *P. vivax* (PvAMA1)

O antígeno PvAMA1 é uma proteína transmembrana secretada pelas Róptrias, componente do complexo apical dos *Plasmodium sp.*, que estão envolvidas na invasão aos hepatócitos (SILVIE et al., 2004) e na reorientação dos merozoítos durante a invasão aos eritrócitos (TRIGLIA et al., 2000; HEALER et al., 2002; MITCHELL et al., 2004). Estas características, adicionado a sua capacidade de estimular anticorpos em pacientes naturalmente infectados (REMARQUE et al., 2008), fazem desta proteína uma candidata vacinal com capacidade protetora contra os estágios pré-eritrocíticos e eritrocíticos como foi demonstrado com diversos estudos (HODDER et al., 2001; BOUILLET et al., 2011a; VICENTIN et al., 2014).

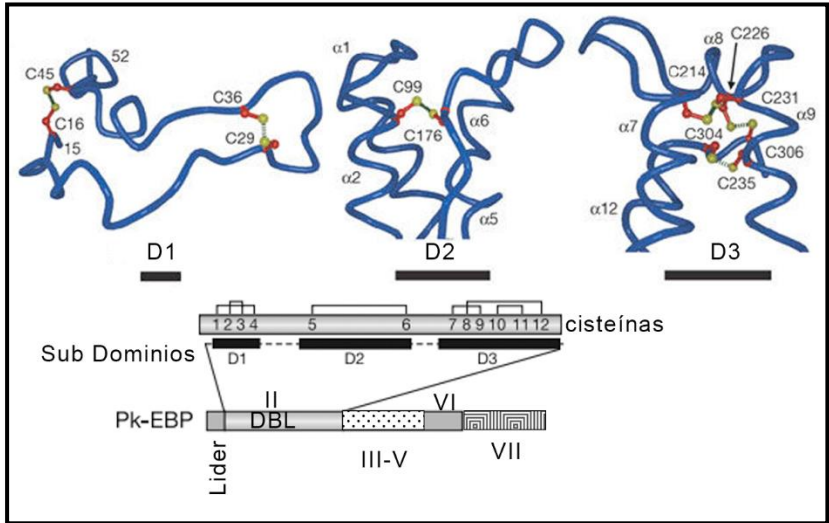
1.3.3.3 Região II da proteína de ligação ao antígeno Duffy do *P. vivax* (PvDBP-II)

A proteína PvDBP (140 kDa), codificada pela família de genes erythrocyte binding ligands (*eb1*), é um constituinte do micronema dos merozoíto. Tal proteína cumpre uma importante função durante a invasão dos parasitos aos eritrócitos (ADAMS et al., 1992; HOWELL et al., 2006).

A PvDBP pode ser dividida em sete regiões, como pode ser observado na **Figura 7:**

- Região I. Sequência do peptídeo líder.
- Região II ou PvDBP-II ou Duffy-binding-ligand (DBL). Região rica em cisteínas.
- Regiões III, IV e V. Regiões hidrofóbicas.
- Região VI. Região rica em cisteínas.
- Região VII. região transmembrana (ADAMS et al., 1992).

Figura 7. Esquema das proteínas PvDBP. As proteínas DBP estão subdivididas em sete regiões denominadas RI-RVII, das quais a RII ou Duffy-binding-like (DBL) é a única envolvida na invasão. A DBL está subdividida em três subdomínios (D1, D2 e D3) nos quais estão localizadas as pontes de dissulfeto envolvidas na adesão eritrocitária especialmente o ponte formado entre a cisteínas cinco e seis.



Fonte. Adaptado de (SINGH et al., 2006).

A PvDBP-II é a região diretamente relacionada com a união aos eritrócitos (CHITNIS; MILLER, 1994; CHITNIS et al., 1996; SINGH et al., 2003). Tal região está subdividida em três subdomínios: D1, D2 e D3, os quais contêm 12 cisteínas, formando 6 pontes de sulfeto, e alta quantidade de aminoácidos aromáticos (ADAMS et al., 1992), como pode ser observado na Figura 7.

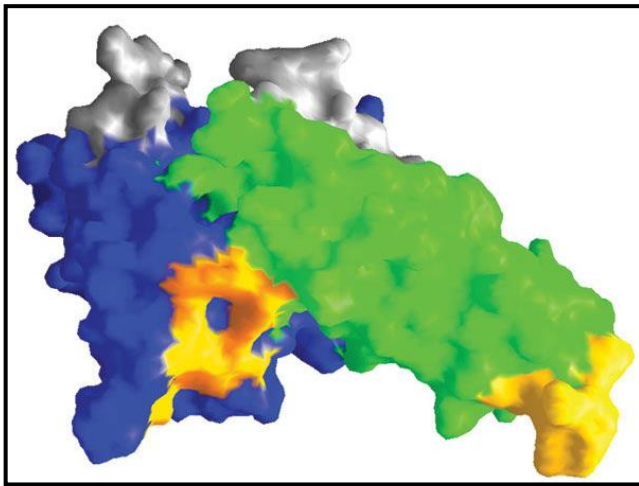
Análises funcionais de tais pontes realizados por Singh, et al. (2003), apontaram que a ponte dissulfeto formada entre as cisteínas C5 e C6, desenvolve uma função essencial na invasão aos eritrócitos via união da região DBL com o receptor do antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) (HORUK et al., 1993). Recentemente, esta união se descreveu como um complexo heterotetrâmico conformado por duas unidades da região DBL e dois DARC (BATCHELOR et al., 2014).

Esta via de invasão, dependente da união DBP-DARC, por muito tempo sugeriu que os humanos deficientes do grupo sanguíneo Duffy (Fy-)

seriam resistentes à invasão dos merozoítos pelo *P. vivax* e *knowlesi* (MILLER et al., 1976; WERTHEIMER; BARNWELL, 1989), não obstante, estudos recentes realizados em pessoas duffy negativas infectadas com *P. vivax* revelaram a presença de vias alternativas para tal processo de invasão (RYAN et al., 2006; CAVASINI et al., 2007; KASEHAGEN et al., 2007) ou a sobre produção da proteína DBP (MENARD, D. et al., 2013).

A DBL além do setor rico em cisteína, apresenta também uma sequência de aminoácidos conservados e um domínio altamente variável, responsável pela sua característica polimórfica (TSUBOI et al., 1994; XAINLI et al., 2000; COLE-TOBIAN et al., 2002; BAUM et al., 2003), que segundo alguns estudos não tem um função na invasão (SINGH et al., 2006) mas podem constituir um mecanismo de evasão ao sistema imune do hospedeiro vertebrado e de seleção natural (AMPUDIA et al., 1996; SINGH et al., 2006), tais setores são apresentados na **Figura 8**.

Figura 8. Representação da superfície molecular da DBL. Azul: Os subdomínios 1 e 2. Verde: Subdomínio 3. Amarelo: Loop do Subdomínio 3. Cinza: Cluster de resíduos polimórficos. Laranja: Sitio de reconhecimento do receptor DARC.



Fonte. Adaptado de (SINGH et al., 2006).

No Brasil, tal polimorfismo foi descrito em diversas populações em contato com a malária, como um resultado direto da presença dos resíduos polimórficos 417, 419 e 424. Estes permitirão dividir os polimorfismos em 3 grupos, denominados de acordo com o estado de procedência em: Pará (PvDBP-II-PA), Mato Grosso (PvDBP-II-MT) e Amazonas (PvDBP-II-AM) (SOUSA et al., 2006; SOUSA et al., 2010; FERREIRA; CASTRO, 2016).

As sequências das PvDBP-II endêmicas do Brasil possuem um efeito sinérgico entre os aminoácidos 417 e 437. Estes polimorfismos foram descritos por Sousa et al. (2006), que adicionalmente relataram que tais variações vêm acompanhadas por modificações no aminoácido 424 na maioria das amostras analisadas, mas não por alterações no aminoácido 503. A partir destas observações e levando em conta que a única diferença entre a sequências do PvDBP-II-AM com as sequências dos PvDBP-II-PA e PvDBP-II-MT é o aminoácido 503, pode se inferir a necessidade de um candidato vacinal baseado no antígeno PvDBP-II polivalente, contendo os polimorfismos locais mais representativos, PvDBP-II-e PvDBP-II-PA.

Os anticorpos contra PvDBP-II sintetizados em pessoas em contato constante com a malária têm as características de as proteger contra futuras reinfecções (FRASER et al., 1997; KING et al., 2008), e aumentar sua quantidade em forma proporcional com o número de exposições à doença (MICHON et al., 1998).

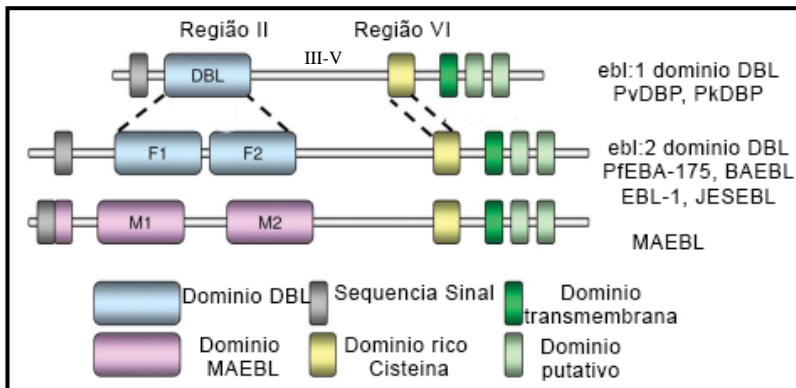
O reconhecimento dos eritrócitos pela região PvDBP-II tem sido demonstrado com sucesso em ensaios *in vitro* (DUTTA et al., 2000; SINGH et al., 2003). Esta região, assim mesmo, tem demonstrado ser altamente imunogênica quando foi formulada conjuntamente com o antígeno MSP1₁₉, em presença do adjuvante Montanide ISA720. Tal mistura, além de estimular maior quantidade dos anticorpos específicos contra cada um dos componentes, demonstrou aumentar a capacidade protetora, em comparação de quando foram administrados de forma individual (DEVI et al., 2007).

O desenvolvimento de uma vacina eficiente formulada com a região DBL, contra a Malária, deverá ser capaz de subjugar os altos níveis de polimorfismo que se apresentam. Neste cenário, a partir dos epítomos mais dominantes no mundo, foi produzida uma sequência denominada DEK^{null} (NTUMNGIA; ADAMS, 2012). Estudos realizados com esta sequência de aa, demonstraram produzir anticorpos inibitórios contra os epítomos do qual derivam, porém em pequenas quantidades (CERAVOLO et al., 2009; CHOOTONG et al., 2010; CHOOTONG et al., 2012; DE CASSAN et al., 2015).

1.3.3.4 Merozoite Apical Erythrocyte Binding-ligand (MAEBL)

A MAEBL (~200 kDa) é uma proteína conservada através de todas as espécies de *Plasmodium sp* (MARTINEZ *et al.*, 2013). Esta proteína é um caso particular da família de genes *eb1*, pois além de apresentar homologia com os conhecidos domínios DBL na região carboxi terminal rica em cisteínas, possui sequência de aminoácidos semelhantes com os subdomínios um e dois da AMA-1 na região amino terminal rica em cisteínas. Tal sequência por sua vez está subdividida em dois domínios semi conservados denominados M1 e M2 (KAPPE *et al.*, 1998; MARTINEZ *et al.*, 2013), este último especialmente, altamente relacionado com a união aos eritrócitos quando expressos em células COS (KAPPE *et al.*, 1998) como pode ser observado na **Figura 9**.

Figura 9. Estrutura genética conservada da família de genes *eb1*. A proteína é a única envolvida na invasão. A RII está subdividida em dois subdomínios (M1 e M2) envolvidas na invasão hepática, eritrocitária e do hospedeiro invertebrado.



Fonte. Adaptado de: (TOLIA *et al.*, 2005).

Inicialmente descrita como proteína dos micronemas dos merozoítos envolvida na invasão dos merozoítos aos eritrócitos (KAPPE *et al.*, 1998), esta proteína recentemente também evidenciou sua presença nas róprias dos esporozoítos (NOE; ADAMS, 1998), assim como sua essencial participação na invasão dos esporozoítos às glândulas salivais dos mosquitos (KARIU *et al.*, 2002)

O gene *maebl*, membro das *eb1 family*, é composto de uma única cópia com estrutura multi-éxon, na qual o domínio DBL, carboxi terminal

típico, é seguida pelos domínios transmembrana e citoplasmático. Já pelo lado do domínio amino terminal, possui uma sequência sinal e os domínios M1 e M2 anteriormente ilustrados na figura 8 (KAPPE et al., 1998).

Recentemente um estudo realizado por Ghai et al. (2002) demonstrou que o domínio M2 da proteína MAEBL do *P. falciparum*, se liga aos eritrócitos, e é reconhecido e inibido pelos soros de pacientes provenientes de regiões endêmicas.

A participação desta proteína na invasão dos esporozoítos aos hepatócitos recentemente também foi estudada por Preiser et al (2004). Neste estudo observou-se 3 tipos de expressão da proteína, cada uma referente a um diferente estágio (esporozoítos da glândula salival, dos merozoítos e esporozoítos invasores dos hepatócitos). Ainda neste trabalho, demonstrou-se que os anticorpos PyMAEBL-M1 e PyMAEBL-M2 são capazes de reconhecer o antígeno PyMAEBL e inibir o desenvolvimento parasitário em cultura primárias de hepatócitos infectados com esporozoítos, evidenciando-se a diferença de expressão nos diferentes estágios .

Mais recentemente, camundongos C57BL/6J imunizados com a proteína heteróloga PyMAEBL-M2 em adjuvante de Freund, demonstraram uma produção balanceada dos anticorpos IgG1 e IgG2, assim como a capacidade do soro de reconhecer o antígeno testado, inibir a invasão *ex vivo* dos hepatócitos pelos merozoítos e diminuir a parasitemia *in vivo* ocasionada pelo desafio com cepas letais, chegando a sobreviver 90% dos animais (LEITE et al., 2015).

Tais características, fazem deste antígeno um interessante componente de futuros candidatos vacinais.

1.4 Tecnologias de vacinação

As vacinas são preparações biológicas formuladas com o intuito de estimular a imunidade contra alguma doença em particular.

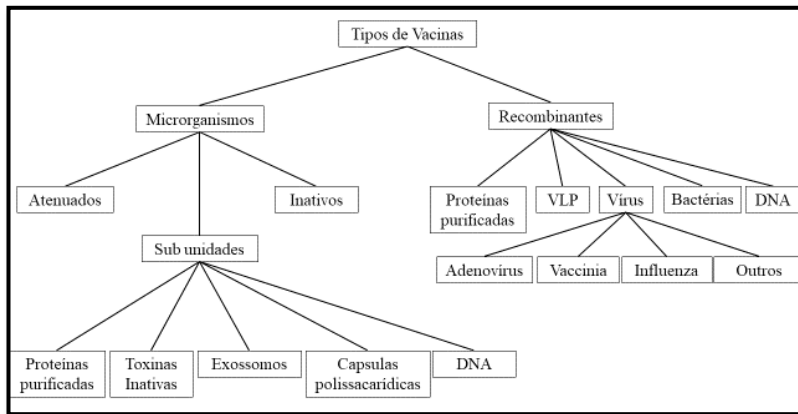
Historicamente, variolização foi uma técnica precursora da vacinação, utilizada para combater a varíola antes do século XVIII na África, Índia e China. Tal técnica consistia na administração a pessoas saudáveis de uma forma mais branda da varíola com o intuito de as proteger contra esta doença.

Esta técnica com o passar dos anos, foi introduzida na Europa, possivelmente por Lady Mary Wortley Montagu, porém sofreu uma forte oposição, ao produzir formas graves da doença ou incluso a morte em aproximadamente 2% das pessoas inoculadas

Neste contexto, foi só no ano 1796 que foi formulada a primeira vacina no mundo. Tal descoberta foi realizada pelo naturalista e médico britânico Edward Jenner, quem utilizou o vírus cowpox da vaca para combater a varíola (RIEDEL, 2005).

Desde então, e com a evolução da biologia molecular, foram formuladas diferentes vacinas, as quais podem estar constituídas por microorganismos atenuados ou inativos ou componentes celulares destes (proteínas, fragmentos de DNA, polissacarídeos, entre outros). Os principais tipos de vacinas estão descritos na **Figura 10**. Como pode se observar nesta figura as vacinas podem se dividir em dois grupos, as que proveem diretamente de microorganismos, ou parte deles, e as sintetizadas artificialmente a partir da utilização das técnicas de DNA recombinante.

Figura 10. Esquema dos principais tipos de vacinas estudados. As vacinas podem ser obtidas naturalmente dos microorganismos ou de forma artificial usando as tecnologias de DNA recombinante. Tais vacinas podem ser formuladas com o microorganismo inteiro atenuado, inativo ou parte deste.



Tais avances tecnológicos têm sido importantes também para o desenvolvimento de novos veículos para a distribuição dos diferentes antígenos, assim como novas ferramentas para a obtenção destes.

1.4.1 Proteínas recombinantes heterólogas

Com os avanços na biologia molecular, na atualidade é possível produzir proteínas heterólogas em diversos sistemas procariotos ou eucariotos mediante a incorporação do DNA alheio. O uso comercial desta técnica tem sido muito empregado na produção industrial de biofármacos, enzimas e insumos agrícolas. Assim, nestes âmbitos, os principais sistemas de produção utilizados são: bactérias, leveduras, fungos filamentosos, insetos, células de mamíferos, cultura de plantas, animais transgênicos e plantas transgênicas (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Tais sistemas são selecionados tomando em conta a qualidade, eficiência e rapidez da produção, assim como as propriedades químicas das proteínas de interesse. Nestas circunstâncias, as pequenas proteínas serão expressas preferencialmente em sistemas procariotos, as glicosiladas serão melhor produzidas em células de mamíferos, fungos ou insetos.

Dentro dos sistemas procariotos, a utilização das bactérias *Escherichia coli* é considerada a menos custosa, sendo mais fácil e rápida (BANEYX, 1999; DEMAIN; VAISHNAV, 2009), porém este sistema não tem capacidade de produzir proteínas mais extensas, ricas em pontes dissulfeto e com modificações pós-traducionais (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

No campo da vacinologia, a primeira vacina produzida com sucesso a partir das proteínas recombinantes foi a vacina contra a hepatite B. Esta vacina foi formulada com a proteína de superfície do vírus HBV (HBsAg), expressa em *Saccharomyces cerevisiae* (MCALEER et al., 1984) em presença do adjuvante alumínio. Após à aparição desta vacina, foram surgindo novas vacinas contra diversas doenças como por exemplo contra a coqueluche (Refortrix-GSK), formulada a partir de 4 proteínas (DECKER; EDWARDS, 2000), contra a doença de lyme (Gardasil-Merck Sharp e Dohme Farmacêutica Ltda.), baseada na lipoproteína OspA produzida em *E. coli* com hidróxido de alumínio (PLOTKIN, 2005).

1.4.2 Adjuvantes

A obtenção dos componentes moleculares procedentes dos diversos agentes etiológicos por meio de processos químicos elaborados, biossínteses ou por técnicas de DNA recombinante, tem outorgado maior biossegurança às vacinas. Porém, estes componentes em forma geral não são tão imunogênicos quanto são os antecessores inativados ou atenuados (PETROVSKY; AGUILAR, 2004). Diante desta dificuldade, a utilização

de moléculas que ajudem a obter os níveis de imunogenicidade necessários, denominadas adjuvantes, tem demonstrado bons resultados.

Estas substâncias tem a capacidade de:

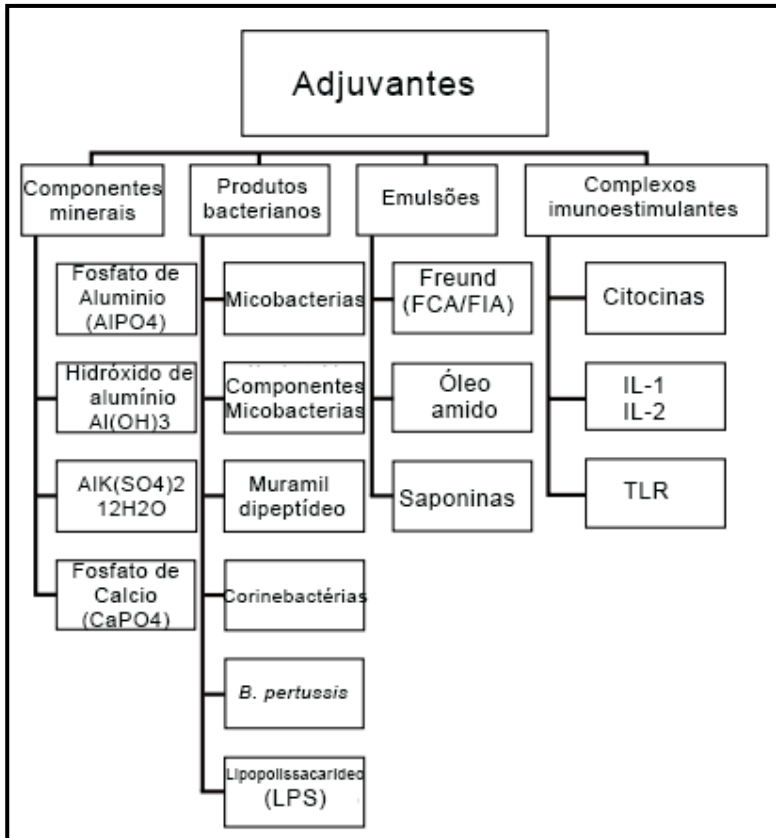
- Aumentar a imunogenicidade dos diversos antígenos (reduzindo desta forma a quantidade necessária de antígenos para estimular uma resposta),
- Reduzir as múltiplas imunizações em protocolos doses-reforço, permitindo vacinações de uma dose,
- Aumentar a duração e velocidade das respostas imunes,
- Modular o isotipo ou subclasse de anticorpo a ser sintetizado,
- Estimular a imunidade celular,
- Promover a indução de imunidade nas mucosas
- Melhorar as respostas imunes em crianças e adultos com sistema imune comprometido ou débil,
- Modificar a apresentação de antígenos em vacinas combinadas (SINGH; O'HAGAN, 1999; PETROVSKY; AGUILAR, 2004; HARINI et al., 2013).

Apesar de que todos os adjuvantes podem aumentar a imunogenicidade do antígeno vacinal, cada adjuvante ativa preferentemente um tipo de resposta imune, o que pode conduzir finalmente, a uma resposta predominante do tipo Th1, Th2 ou Th17, dentre outras. Diante deste panorama, a escolha do tipo de adjuvante a ser usado deverá considerar, além do tipo de resposta desejado, a via de administração, a espécie a ser vacinada e o antígeno a ser usado (PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

Historicamente, desde os anos 1920 quando foi desenvolvido o primeiro adjuvante baseado em componentes minerais especialmente nos sais de alumínio, estes têm passado por uma série de aprimoramentos quanto a seu tempo de vida, ser biodegradáveis, custo de produção e não gerar resposta contra eles mesmos. Assim, os adjuvantes podem ser classificados em componentes minerais, produtos bacterianos, emulsões e complexos imunoestimulantes como pode ser observado na figura 11.

Outros potentes imunoestimuladores são os produtos derivados de bactérias, por exemplo a flagelina bacteriana (MCSORLEY et al., 2002) e as proteínas de choque térmico (EBRAHIMI; TEBIANIAN, 2011) ou os complexos imunoestimuladores formulados com citocinas pro inflamatórias, interleucinas e receptores do tipo toll (BATISTA-DUHARTE et al., 2011).

Figura 11. Classificação convencional dos principais adjuvantes utilizados na atualidade. Os adjuvantes podem ser classificados em quatro categorias Componentes minerais (a maioria derivados das sais de alumínio), derivados bacterianos (como a flagelina, proteínas de choque térmico e derivados das paredes microbianas), as emulsões (como os adjuvantes completos e incompletos de Freund, emulsões óleo-agua e saponinas) e os complexos imunoestimuladores (como as citocinas, interleucinas e receptores do tipo toll).



Fonte. Adaptado de: (HARINI et al., 2013).

Finalmente, o grupo das emulsões pode ser sub dividido em três grupos: as derivadas do adjuvante de Freund (Adjuvante completo e incompleto de Freund), saponinas e óleo amido. É neste grupo dos adjuvantes baseados na emulsão óleo-água, que podemos ubicar ao Montanide ISA

720. Este adjuvante produzido a partir do óleo esqualeno e do surfactante refinado baseado em monoleato de manide, permitem a liberação gradativa dos antígenos, funcionando assim como uma fonte duradoura de antígenos (PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

A eficiência deste adjuvante tem sido comprovada em estudos em camundongos imunizados com as proteínas PvDBP-II e MSP-1 formuladas com os adjuvantes Montanide ISA 720 ou Alhydrogel. Neste estudo se observou que aqueles animais imunizados com o adjuvante Montanide ISA720 foram capazes de estimular a produção de maior quantidade de anticorpos contra tais antígenos (DEVI et al., 2007).

Benefícios similares foram observados em provas realizadas em camundongos utilizando os antígenos PfMSP-1₁₉ e PfEBA-175 (DE CASSAN et al., 2011; DE CASSAN et al., 2015), em coelhos e primatas não humanos, rhesus (*Macaca mulata*), imunizados com candidatos vacinais formulados com o antígeno PfCP-2.9 (conformado pelas proteínas pré-eritrocíticas AMA-1 e MSP1₁₉), nos quais se observou uma maior produção dos anticorpos em presença do adjuvante Montanide ISA720 em comparação com aqueles que foram imunizados só com a proteína quimérica (PAN et al., 2004).

1.4.3 Adenovírus recombinantes

Os adenovírus são vírus não envelopados, icosaédricos de ~ 90nm de diâmetro, pertencentes a família *Adenoviridae*. Estes vírus possuem um DNA dupla fita linear de aproximadamente 36kb e são agentes etiológicos de diversas doenças respiratórias, oculares e intestinais em aves e mamíferos, incluindo o homem, no qual podem causar sintomas desde leves até letais no caso dos indivíduos imunossuprimidos (BERK, 2013).

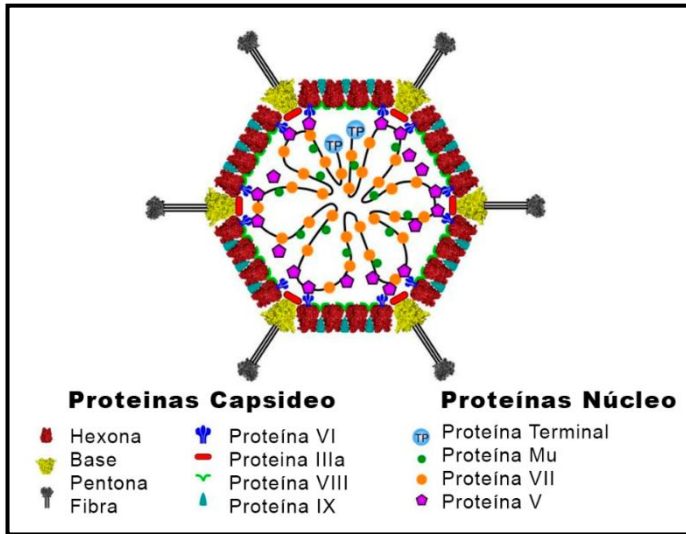
Atualmente, tem sido identificados 57 sorotipos diferentes de adenovírus humanos (HAd), os quais estão agrupados em 6 diferentes espécies (A-G) de acordo com sua sorologia, capacidade de hemaglutinação, oncogenicidade em roedores, capacidade de transformação em cultura celular primarias e sequência genética (NEMEROW et al., 2009; BERK, 2013).

Estes vírus possuem uma capsídeo com 720 proteínas héxons, distribuídas como 240 trímeros, uma base pentona em cada um dos cinco vértices do icosaedro associada com uma ou duas fibras. Cada uma das 20 faces da capsídeo possui 12 trímeros de héxons e uma pentona por vértice. A unidade icosaédrica assimétrica consiste em quatro trímeros de héxons e uma base pentona (REDDY et al., 2010). Adicionalmente, no capsídeo o vírus possui uma proteína, denominada pIX, que faz o papel

de cimento entre os héxons, e no lado interno três pequenas proteínas, pIIIa, pVI e pVIII envolvidas na maturação viral.

O DNA viral localizado no núcleo do vírus, encontra-se associado a numerosas cópias das proteínas V, VII e μ , as quais são clivadas por proteases virais após de estabelecido no núcleo do hospedeiro (NEMEROW et al., 2009). O esquema estrutural dos adenovírus é apresentado na **Figura 12**.

Figura 12. Esquema da estrutura do Adenovírus. Os adenovírus são vírus não envelopados, icosaédricos (~ 90nm). Tais vírus estão constituídos no capsídeo principalmente pelas proteínas héxona, base pentona e uma ou duas fibras, e no núcleo pelas proteínas V, VII, Um e terminal.



Fonte. (NEMEROW et al., 2009).

O genoma do HAd contém cinco unidades de transcrição imediatas (E1A, E1B, E2, E3 e E4), quatro intermediárias (IX, IVa2, L4 intermediário e E2A tardio) e uma unidade de transcrição tardia (Maior Tardio), esta última responsável por gerar a família de mRNA tardios (L1, L2, L3, L4 e L5) por intermédio do *major late promoter* (BERK, 2013).

São diversas as funções dos produtos de cada uma destas unidades, assim, da transcrição da unidade E1A, se obtém duas proteínas responsáveis pela transcrição e por induzir a fase S nas células hospedeiras, E1B, duas proteínas que boqueiam a apoptoses, da unidade E2, três proteínas

imunomoduladora remanescente que apresentam, a qual, pode modificar respostas imunes nos hospedeiro e desta forma estimular proteção contra diversas doenças (ZHANG et al., 2001; TATSIS; ERTL, 2004; BANGARI; MITTAL, 2006; PRIDDY et al., 2008; PINE et al., 2011; FRAHM et al., 2012; ZAK et al., 2012).

Os antígenos heterólogos podem ser inseridos em diversas regiões do genoma do Ad, especialmente nas regiões E1, E3 e E4, (IMLER, 1995), sempre que não supere a capacidade máxima de empacotamento do capsídeo de 2Kb (MCGRORY et al., 1988; TATSIS; ERTL, 2004)

Atualmente, se lhes denomina HAd de primeira geração, aos HAd que têm a região E1 (E1A e E1B) substituída pela sequência do antígeno, e tem a possibilidade de aumentar sua capacidade de clonagem pela excisão da região não essencial E3 (BERK, 2013). Tais rHAd têm a capacidade de se desenvolver em limitado número de células, sendo as principais as células HEK293 (células de embrião de rim humano transformadas com fragmentos de DNA dos adenovírus tipo 5) (GRAHAM et al., 1977). Já os HAd de segunda geração, são aqueles com deleção das regiões E1-2-3 e 4.

O emprego dos rHAd não replicativos como vetores vacinais possui como vantagens:

- Uma biologia do vírus bem estudada.
- Correto desenvolvimento do vírus em diversas culturas celulares outorgando altos títulos virais sem precisar incorporar seu material genético no hospedeiro (BERK, 2013).
- Vírus bioseguros, ao ter deletado diferentes regiões essenciais para garantir que não sejam capazes de replicar (LIMBACH; RICHIE, 2009)
- Infecções autolimitadas nos organismos hospedeiro ao mesmo tempo em que estimulam respostas imunes inata, celulares (CD8+T) e humorais contra os antígenos exógenos expressados (TATSIS; ERTL, 2004; SCHULDT; AMALFITANO, 2012).

Os sorotipos de adenovírus mais utilizadas como vetores vacinais contra a malária e que estão sendo testadas em alguma fase clínica pelas suas propriedades de induzirem tanto a resposta imune inata quanto adaptativa em hospedeiros mamíferos são: E (Adenovírus de chimpanzés-ChAd63), B (HAd35), D (HAd26) e C (HAd5) (SCHAGEN et al., 2004; TATSIS; ERTL, 2004; HOLLINGDALE et al., 2017), esta última altamente imunogênico e com comprovada capacidade de estimular a resposta imune de memória (CASTELUBER, 2010; BOUILLET et al., 2011a). Na

Tabela 2 são apresentados os adenovírus recombinantes estudados em estágio clínico para combater qualquer tipo de malária.

Tabela 2. Candidatos vacinais contra malária em estágio clínico formulados com adenovírus recombinante. E (Adenovírus de Chimpanzé -ChAd63), B (HAd35), D (HAd26) e C (HAd5). PF= *P. falciparum*, PV= *P. vivax*.

Vacina/ Antígeno	Antígeno	Alvo	Fase	% Proteção
HAd5	CSP + AMA1	PF	1	Não testado (SEDEGAH et al., 2011)
HAd5/HAd5	CSP	PF	1/2a	0 (TAMMIN GA et al., 2013)
HAd5	CSP + AMA1	PF	1/2a	0 (TAMMIN GA et al., 2013)
DNA/HAd5	CSP + AMA1	PF	1/2a	27 (CHUANG et al., 2013; SEDEGAH et al., 2014)
HAd35	CSP	PF	1	Não testado (CREECH et al., 2013)
HAd35	CSP	PF	1	Não testado (OUÉDRA OGO et al., 2013)
HAd35	CSP + RTS,S	PF	1/2a	44 (OCKENH OUSE et al., 2015)
	RTS,S			52 (OCKENH OUSE et al., 2015)

ChAd63/MVA	ME-TRAP	PF	1	Não testado (O'HARA et al., 2012)
ChAd63/MVA	ME-TRAP	PF	1/2a	21 (EWER et al., 2013)
ChAd63/MVA	MSP1	PF	1	Não testado (SHEEHY et al., 2012a; SHEEHY et al., 2012b; ELIAS et al., 2013)
	AMA1		1	
ChAd63/MVA	AMA1	PF	1/2a	0 (SHEEHY et al., 2012b; ELIAS et al., 2013; BISWAS et al., 2014; ELIAS et al., 2014)
	ME-TRAP + MSP1	PF		0 (SHEEHY et al., 2012b; ELIAS et al., 2013; BISWAS et al., 2014; ELIAS et al., 2014)
	MSP1 + AMA1	PF		11 (SHEEHY et al., 2012b; ELIAS et al., 2013;

				BISWAS et al., 2014; ELIAS et al., 2014)
	MSP1	PF		0 (SHEEHY et al., 2012b; ELIAS et al., 2013; BISWAS et al., 2014; ELIAS et al., 2014)
ChAd63/MVA	ME-TRAP	PF	1	Não testado (OGWANG et al., 2013; KIMANI et al., 2014)
ChAd63	CSP	PF	1	Não testado (DE BARRA et al., 2014)
ChAd63/MVA				
ChAd63/MVA	CSP	PF	1/2a	7 (HODGSON et al., 2015)
	ME-TRAP			13 (HODGSON et al., 2015)
ChAd63/MVA	ME-TRAP	PF	1/2a	67 (OGWANG et al., 2015)
ChAd63/MVA	ME-TRAP/EPI		1	Não testado (AFOLABI et al., 2016)
ChAd63/MVA	PvDBP	PV	1	Não testado
ChAd63/MVA	RTS,S + ME-TRAP	PF	1/2	82 (RAMPLIN

				G et al., 2016)
	RTS,S	PF	1/2	75 (RAMPLIN G et al., 2016)

Fonte. Adaptado de: (HOLLINGDALE et al., 2017).

A imunização com tais adenovírus em todos os casos implica a utilização de protocolos de dose-reforço ou prime –boost.

1.4.4 Protocolos de Dose-reforço ou Prime-boost

A baixa imunogenicidade estimulada por diferentes candidatos vacinais, especialmente aqueles formulados a partir de subunidades dos agentes etiológicos, tem sido um dos principais obstáculos para o desenvolvimento de novas vacinas eficientes no controle de diferentes doenças.

Por este motivo, na atualidade a grande maioria de vacinas formuladas com agentes etiológicos inativos, atenuados, ou por subunidades recombinantes destes, requerem a aplicação de dois ou mais reforços para obter valores significativos de imunogenicidade

Os protocolos de dose-reforço podem ser classificados de acordo com os tipos de vetores vacinais a ser utilizados em: Homólogo (quando os antígenos são subministrados pelo mesmo vetor na primeira dose e nos reforços) e Heterólogo (quando são administrados diferentes vetores na dose e nos reforços).

Antígenos do estágio pré-eritrocítico administrados com protocolos dose-reforço heterólogo demonstraram ser capazes de bloquear o estágio pré-eritrocítico do parasito, ao estimular tanto uma imunidade humoral quanto celular (BIRKETT et al., 2013).

Do mesmo modo, estudos realizados em primatas não humanos com tal protocolo de estímulo inicial com gp160 do SIV expressa em vaccínia vírus e reforço com proteína gp160 expressa em células infectadas com báculo vírus, resultaram em 100% dos animais protegidos quando desafiados com vírus imunodeficiência símia (SIV) (HU SL et al., 1992). Considerando a relevância de tais resultados, os protocolos dose-reforço, ou prime-boost, heterólogos estão sendo amplamente utilizados para elaborar outros candidatos vacinais contra malária, hepatite C, AIDS ou anthrax (MCCONNELL et al., 2007; WINSTONE et al., 2009; FOURNILLIER et al., 2013).

No modelo de malária murina, a PyCS, primeira proteína testada com o protocolo dose (vírus influenza ou vaccínia recombinantes) -reforço (vírus influenza ou vaccínia recombinantes), demonstrou que a ordem dos vetores é importante para a obtenção da resposta imune desejada (LI et al., 1993). Posteriormente, Bruña-Romero et al., (2001) imunizaram camundongos BALB/c com prime (AdPyCS) -boost (VacPyCS) e obtiveram um aumento de células T CD8⁺ e T CD4⁺, altos títulos de anticorpos inibitórios de esporozoíto e uma inibição de 100% do desenvolvimento do ciclo de vida do parasito após de três meses e meio da aplicação do prime. Neste mesmo contexto, González-Aseguinolaza *et al.* (2003) propuseram o uso de prime (influenza adaptado ao frio) – boost (MVA atenuado) para diminuir os riscos de usar uma vacina com influenza moderadamente atenuada, conseguindo induzir proteção nos camundongos expostos a *P. yoelii*.

Por outra parte, os vetores de DNA com os antígenos PbCS e PbTRAP também foram testados em protocolo prime (DNA)-boost (MVA), alcançando-se uma proteção mais eficiente nos camundongos imunizados com a mistura ou apenas com PbCS (SCHNEIDER et al., 1998). Assim mesmo, tais antígenos protegeram totalmente camundongos C57BL/6, quando foram imunizados com protocolo dose (AdPbCS e AdPbTRAP)-reforço (proteína PbCS e VacPbTRAP) (BAUZA et al., 2015).

Os protocolos heterólogos (proteína-adenovírus) também demonstraram ser eficientes no controle do *P. vivax*, como foi observado em estudos com os antígenos do estágio eritrocítico AMA-1, realizados por Bouillet et al. (2011) em camundongos, nos quais se observou o estímulo de respostas mediadas por anticorpos, assim como a proliferação de células T de memória. Adicionalmente, De Cassane et al. (2015), utilizaram os poxvirus e adenovírus recombinantes expressando a PvDBP variante Salvador I, detectando a presença de anticorpos e células T nos camundongos e coelhos imunizados. Os anticorpos gerados aderiram aos parasitos nativos e inibiram a adesão ao receptor DARC em experimentos *in vitro*. Este mesmo fenômeno protetor, já tinha sido descrito anteriormente pela aluna de doutorado do nosso grupo Marisa F. Casteluber (2010) e foi um dos alvos do nosso trabalho atual.

2 JUSTIFICATIVA

A Malária é um problema de saúde mundial, que atinge especialmente os países da África e do Sudeste Asiático. Em 2015, segundo o último informe da Organização Mundial da Saúde, foram diagnosticados 212 milhões de novos casos no mundo, a maioria crianças entre dois a dez anos. Embora estes números tenham diminuído nos últimos anos, o surgimento de espécies de *Plasmodium* resistentes às drogas e de mosquitos vetores resistentes aos principais inseticidas, poderiam comprometer os avanços obtidos até o momento.

O *P. vivax* é a espécie mais distribuída fora da Região Africana. Inicialmente foi descrito como um parasito benigno, conceito que nos últimos anos tem sido modificado por causa do aparecimento de sintomas graves, que em alguns casos desencadearam a morte.

Diante deste panorama, uma solução viável para o controle da malária poderia ser o desenvolvimento de uma vacina regional eficiente contra as principais espécies. Tal desenvolvimento pode estar focado em combater um ou mais dos três estágios do ciclo de vida do parasito (estágio sexual, estágio pré-eritrocitário e estágio eritrocitário).

Diversos autores têm manifestado que o desenvolvimento de uma vacina contra o estágio eritrocítico poderia prevenir a invasão dos eritrócitos e, por conseguinte, a liberação dos produtos tóxicos responsáveis pela aparição dos diversos sintomas da doença.

Neste panorama, as proteínas encarregadas do reconhecimento dos eritrócitos, se mostram como os antígenos mais promissores para o desenvolvimento desta vacina.

Diversos estudos têm realçado a importância na invasão dos eritrócitos da proteína AMA1, do fragmento C-terminal da MSP-1, da região II da proteína Duffy-Binding Protein do *P. vivax* (PvDBP-II), assim como da região M2 da proteína Merozoite Apical Erythrocyte Binding-ligand (MAEBL-M2), e têm demonstrado que tais antígenos estimulam as respostas imunes humorais e celulares, assim como induzem altas taxas de sobrevivência em modelos murinos e em primatas não humanos imunizados. Porém, maiores estudos são necessários para determinar a formulação vacinal ideal, assim como o sistema de entrega mais eficiente. Na atualidade os vetores virais recombinantes, como o adenovírus tipo 5 usado neste estudo, são capazes de potencializar as respostas imunes celulares e humorais, o que os converte em excelentes vectores vacinais para serem usados sozinhos ou, de forma mais eficiente, em protocolos de imunização mistos (prime-boost heterólogo) junto a outras apresentações dos mesmos antígenos parasitários.

Baseado neste panorama, e na falta de capacidade dos *P. vivax* de infectar camundongos, o presente trabalho buscou avaliar a eficiência de uma vacina multiantigênica formulada com as variantes PvDBP-II-MT e PA, administrada por vectores virais recombinantes ou como proteínas recombinantes purificadas em presença do adjuvante Montanide ISA 720, em primatas não humanos antes e após o desafio com *P. vivax*. Adicionalmente, o presente estudo pretendeu avaliar a capacidade protetora em camundongos de um novo antígeno baseado na proteína MAEBL-M2 dos *P. vivax*.

Hipótese

As vacinas formuladas com antígenos que atingem dois ou mais estágios são mais imunogênicas e eficientes que aquelas formuladas só com um antígeno.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma vacina antimalárica, contra a infecção causada pelo *Plasmodium vivax*, baseada em antígenos da fase eritrocítica do ciclo de vida do parasito.

3.2 Objetivos específicos

- **Avaliar nos primatas não humanos *Aotus lemurinus griseimembra* imunizados com uma vacina experimental baseada nos antígenos MSP1₁₉, AMA1 e DBP-II-MT e PA da fase eritrocítica do *P. vivax* as respostas imunes e a capacidade protetora contra o parasito.**
 - Imunizar macacos *Aotus lemurinus griseimembra* com as quatro proteínas purificadas e adenovírus recombinantes correspondentes.
 - Avaliar as respostas imunes humorais e celulares induzidas pelos candidatos vacinais.
 - Determinar a capacidade protetora *in vivo* dos candidatos vacinais após o desafio com *P. vivax*.
- **Otimizar a formulação vacinal multiantigênica, a partir da produção da proteína recombinante MAEBL-M2**
 - Produzir e purificar adenovírus recombinantes capazes de expressar as proteínas PvMAEBL-M2.
 - Determinar a capacidade protetora *in vivo* do candidato vacinal otimizado.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. H.; SIM, B. K. L.; DOLAN, S. A.; FANG, X.; KASLOW, D. C.; MILLER, L. H. A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, n.15, p.7085-7089, 1992.

AFOLABI, M. O.; TIONO, A. B.; ADETIFA, U. J.; YARO, J. B.; DRAMMEH, A.; NÉBIÉ, I.; BLISS, C.; HODGSON, S. H.; ANAGNOSTOU, N. A.; SANOU, G. S.; JAGNE, Y. J.; OUEDRAOGO, O.; TAMARA, C.; OUEDRAOGO, N.; OUEDRAOGO, M.; NJIE-JOBE, J.; DIARRA, A.; DUNCAN, C. J. A.; CORTESE, R.; NICOSIA, A.; ROBERTS, R.; VIEBIG, N. K.; LEROY, O.; LAWRIE, A. M.; FLANAGAN, K. L.; KAMPMAN, B.; BEJON, P.; IMOUKHUEDE, E. B.; EWER, K. J.; HILL, A. V. S.; BOJANG, K.; SIRIMA, S. B. Safety and Immunogenicity of ChAd63 and MVA ME-TRAP in West African Children and Infants. **Molecular Therapy**, v.24, n.8, p.1470-1477, 2016.

AMPUDIA, E.; PATARROYO, M. A.; PATARROYO, M. E.; MURILLO, L. A. Genetic polymorphism of the Duffy receptor binding domain of *Plasmodium vivax* in Colombian wild isolates. **Mol Biochem Parasitol**, v.78, n.1-2, p.269-272, 1996.

ARÉVALO-HERRERA, M.; FORERO-PEÑA, D. A.; RUBIANO, K.; GÓMEZ-HINCAPIE, J.; MARTÍNEZ, N. L.; LOPEZ-PEREZ, M.; CASTELLANOS, A.; CÉSPEDES, N.; PALACIOS, R.; OÑATE, J. M.; HERRERA, S. *Plasmodium vivax* Sporozoite Challenge in Malaria-Naïve and Semi-Immune Colombian Volunteers. **PLoS ONE**, v.9, n.6, p.e99754, 2014.

ARMISTEAD, J. S.; MORLAIS, I.; MATHIAS, D. K.; JARDIM, J. G.; JOY, J.; FRIDMAN, A.; FINNEFROCK, A. C.; BAGCHI, A.; PLEBANSKI, M.; SCORPIO, D. G.; CHURCHER, T. S.; BORG, N. A.; SATTABONGKOT, J.; DINGLASAN, R. R. Antibodies to a Single, Conserved Epitope in Anopheles APN1 Inhibit Universal Transmission of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Malaria. **Infect Immun**, v.82, n.2, p.818-829, 2014.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, n.5, p.411-421, 1999.

BANGARI, D. S.; MITTAL, S. K. Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. **Curr Gene Ther**, v.6, n.2, p.215-26, 2006.

BARGIERI, D. Y.; ROSA, D. S.; BRAGA, C. J. M.; CARVALHO, B. O.; COSTA, F. T. M.; ESPÍNDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; SOARES, I. S.; FERREIRA, L. C. S.; RODRIGUES, M. M. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella Typhimurium* FliC flagellin. **Vaccine**, v.26, n.48, p.6132-6142, 2008.

BASURKO, C.; DEMATTEI, C.; HAN-SZE, R.; GRENIER, C.; JOUBERT, M.; NACHER, M.; CARME, B. Deforestation, agriculture and farm jobs: a good recipe for *Plasmodium vivax* in French Guiana. **Malaria J**, v.12, n.1, p.90, 2013.

BATCHELOR, J. D.; MALPEDE, B. M.; OMATTAGE, N. S.; DEKOSTER, G. T.; HENZLER-WILDMAN, K. A.; TOLIA, N. H. Red Blood Cell Invasion by *Plasmodium vivax*: Structural Basis for DBP Engagement of DARC. **PLoS Pathog**, v.10, n.1, p.e1003869, 2014.

BATISTA-DUHARTE, A.; LINDBLAD, E. B.; OVIEDO-ORTA, E. Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. **Toxicology Letters**, v.203, n.2, p.97-105, 2011.

BAUM, J.; THOMAS, A.; CONWAY, D. Evidence for diversifying selection on erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. **Genetics**, v.163, p.1327 - 1336, 2003.

BAUZA, K.; ATCHESON, E.; MALINAUSKAS, T.; BLAGBOROUGH, A. M.; REYES-SANDOVAL, A. Tailoring a combination pre-erythrocytic malaria vaccine. **Infection and Immunity**, 2015.

BAUZA, K.; MALINAUSKAS, T.; PFANDER, C.; ANAR, B.; JONES, E. Y.; BILLKER, O.; HILL, A. V. S.; REYES-SANDOVAL, A. Efficacy of a *Plasmodium vivax* Malaria Vaccine Using ChAd63 and Modified Vaccinia Ankara Expressing Thrombospondin-Related Anonymous Protein as Assessed with Transgenic *Plasmodium berghei* Parasites. **Infection and Immunity**, v.82, n.3, p.1277-1286, 2014.

BENNETT, J. W.; YADAVA, A.; TOSH, D.; SATTABONGKOT, J.; KOMISAR, J.; WARE, L. A.; MCCARTHY, W. F.; COWDEN, J. J.; REGULES, J.; SPRING, M. D.; PAOLINO, K.; HARTZELL, J. D.; CUMMINGS, J. F.; RICHIE, T. L.; LUMSDEN, J.; KAMAU, E.; MURPHY, J.; LEE, C.; PAREKH, F.; BIRKETT, A.; COHEN, J.; BALLOU, W. R.; POLHEMUS, M. E.; VANLOUBBEECK, Y. F.; VEKEMANS, J.;

OCKENHOUSE, C. F. Phase 1/2a Trial of Plasmodium vivax Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. **PLoS Negl Trop Dis**, v.10, n.2, p.e0004423, 2016.

BERK, A. J. *Adenoviridae*. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. v.1, p. 1704-1731.

BIRKETT, A. J.; MOORTHY, V. S.; LOUCQ, C.; CHITNIS, C. E.; KASLOW, D. C. Malaria vaccine R&D in the Decade of Vaccines: Breakthroughs, challenges and opportunities. **Vaccine**, v.31, Supplement 2, p.B233-B243, 2013.

BISWAS, S.; CHOUDHARY, P.; ELIAS, S. C.; MIURA, K.; MILNE, K. H.; DE CASSAN, S. C.; COLLINS, K. A.; HALSTEAD, F. D.; BLISS, C. M.; EWER, K. J.; OSIER, F. H.; HODGSON, S. H.; DUNCAN, C. J. A.; O'HARA, G. A.; LONG, C. A.; HILL, A. V. S.; DRAPER, S. J. Assessment of Humoral Immune Responses to Blood-Stage Malaria Antigens following ChAd63-MVA Immunization, Controlled Human Malaria Infection and Natural Exposure. **PLoS ONE**, v.9, n.9, p.e107903, 2014.

BOUILLET, L. É. M.; DIAS, M. O.; DORIGO, N. A.; MOURA, A. D.; RUSSELL, B.; NOSTEN, F.; RENIA, L.; BRAGA, É. M.; GAZZINELLI, R. T.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S.; BRUNA-ROMERO, O. Long-Term Humoral and Cellular Immune Responses Elicited by a Heterologous Plasmodium vivax Apical Membrane Antigen 1 Protein Prime/Adenovirus Boost Immunization Protocol. **Infection and Immunity**, v.79, n.9, p.3642-3652, 2011a.

BRUÑA-ROMERO, O.; GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA, G.; HAFALLA, J. C. R.; TSUJI, M.; NUSSENZWEIG, R. S. Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.20, p.11491-11496, 2001.

CABRAL-MIRANDA, G.; HEATH, M.; MOHSEN, M.; GOMES, A.; ENGEROFF, P.; FLAXMAN, A.; LEORATTI, F.; EL-TURABI, A.; REYES-SANDOVAL, A.; SKINNER, M.; KRAMER, M.; BACHMANN, M. Virus-Like Particle (VLP) Plus Microcrystalline Tyrosine (MCT) Adjuvants Enhance Vaccine Efficacy Improving T and B Cell Immunogenicity and Protection against Plasmodium berghei/vivax. **Vaccines**, v.5, n.2, p.10, 2017.

CALVO, P. A.; DALY, T. M.; LONG, C. A. Both epidermal growth factor-like domains of the merozoite surface protein-1 from *Plasmodium yoelii* are required for protection from malaria. **Ann N Y Acad Sci.** 797: 260-262 p. 1996.

CARTER, R.; MENDIS, K. N. Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.4, p.564-594, 2002.

CARVALHO, B. O.; LOPES, S. C. P.; NOGUEIRA, P. A.; ORLANDI, P. P.; BARGIERI, D. Y.; BLANCO, Y. C.; MAMONI, R.; LEITE, J. A.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S.; OLIVEIRA, T. R.; WUNDERLICH, G.; LACERDA, M. V. G.; DEL PORTILLO, H. A.; ARAÚJO, M. O. G.; RUSSELL, B.; SUWANARUSK, R.; SNOUNOU, G.; RÉNIA, L.; COSTA, F. T. M. On the Cytoadhesion of *Plasmodium vivax*-Infected Erythrocytes. **Int J Infect Dis** v.202, n.4, p.638-647, 2010.

CASTELUBER, M. C. D. F. **Desenvolvimento e análise funcional de uma vacina contra *Plasmodium vivax*, baseada na Proteína de Ligação ao antígeno Duffy (DBP) do parasito, administrada na forma de proteínas e adenovírus recombinantes mediante protocolos dose – reforço.** 2010. f. (Doctor) - Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CAVASINI, C.; DE MATTOS, L.; COUTO, A.; COUTO, V.; GOLLINO, Y.; MORETTI, L.; BONINI-DOMINGOS, C.; ROSSIT, A.; CASTILHO, L.; MACHADO, R. Duffy blood group gene polymorphisms among malaria vivax patients in four areas of the Brazilian Amazon region. **Malar J**, v.6, n.1, p.167, 2007.

CERAVOLO, I. P.; SANCHEZ, B. A. M.; SOUSA, T. N.; GUERRA, B. M.; SOARES, I. S.; BRAGA, E. M.; MCHENRY, A. M.; ADAMS, J. H.; BRITO, C. F. A.; CARVALHO, L. H. Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single malaria infection. **Clin Exp Immunol**, v.156, n.3, p.502-510, 2009.

CHITNIS, C.; CHAUDHURI, A.; HORUK, R.; POGO, A.; MILLER, L. The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. **J Exp Med**, v.184, p.1531 - 1536, 1996.

CHITNIS, C.; MILLER, L. Identification of the erythrocytes binding domains of Plasmodium vivax and Plasmodium knowlesi proteins involved in erythrocyte invasion. **J Exp Med**, v.180, p.497 - 506, 1994.

CHOOTONG, P.; NTUMNGIA, F. B.; VANBUSKIRK, K. M.; XAINLI, J.; COLE-TOBIAN, J. L.; CAMPBELL, C. O.; FRASER, T. S.; KING, C. L.; ADAMS, J. H. Mapping Epitopes of the Plasmodium vivax Duffy Binding Protein with Naturally Acquired Inhibitory Antibodies. **Infect Immun**, v.78, n.3, p.1089-1095, 2010.

CHOOTONG, P.; PANICHAKUL, T.; PERMMONGKOL, C.; BARNES, S. J.; UDOMSANGPETCH, R.; ADAMS, J. H. Characterization of Inhibitory Anti-Duffy Binding Protein II Immunity: Approach to Plasmodium vivax Vaccine Development in Thailand. **PLoS ONE**, v.7, n.4, p.e35769, 2012.

CHUANG, I.; SEDEGAH, M.; CICALTELLI, S.; SPRING, M.; POLHEMUS, M.; TAMMINGA, C.; PATTERSON, N.; GUERRERO, M.; BENNETT, J. W.; MCGRATH, S.; GANESHAN, H.; BELMONTE, M.; FAROOQ, F.; ABOT, E.; BANANIA, J. G.; HUANG, J.; NEWCOMER, R.; REIN, L.; LITILIT, D.; RICHIE, N. O.; WOOD, C.; MURPHY, J.; SAUERWEIN, R.; HERMSEN, C. C.; MCCOY, A. J.; KAMAU, E.; CUMMINGS, J.; KOMISAR, J.; SUTAMIHARDJA, A.; SHI, M.; EPSTEIN, J. E.; MAIOLATESI, S.; TOSH, D.; LIMBACH, K.; ANGOV, E.; BERGMANN-LEITNER, E.; BRUDER, J. T.; DOOLAN, D. L.; KING, C. R.; CARUCCI, D.; DUTTA, S.; SOISSON, L.; DIGGS, C.; HOLLINGDALE, M. R.; OCKENHOUSE, C. F.; RICHIE, T. L. DNA Prime/Adenovirus Boost Malaria Vaccine Encoding P. falciparum CSP and AMA1 Induces Sterile Protection Associated with Cell-Mediated Immunity. **PLOS ONE**, v.8, n.2, p.e55571, 2013.

CISSE, M.; KEITA, C.; DICKO, A.; DENGELA, D.; COLEMAN, J.; LUCAS, B.; MIHIGO, J.; SADOU, A.; BELEMVIRE, A.; GEORGE, K.; FORNADEL, C.; BEACH, R. Characterizing the insecticide resistance of Anopheles gambiae in Mali. **Malaria Journal**, v.14, n.1, p.327, 2015.

COLE-TOBIAN, J.; CORTES, A.; BAISOR, M.; KASTENS, W.; XAINLI, J.; BOCKARIE, M.; ADAMS, J.; KING, C. Age-acquired immunity to a Plasmodium vivax invasion ligand, the Duffy binding protein. **J Infect Dis**, v.186, p.531 - 539, 2002.

COLLINS, W. E.; CONTACOS, P. G. Immunization of monkeys against Plasmodium cynomolgi by X-irradiated sporozoites. **Nat New Biol.**, v.236, n.67, p.176-177, 1972.

COLLINS, W. E.; KASLOW, D. C.; SULLIVAN, J. S.; MORRIS, C. L.; GALLAND, G. G.; YANG, C.; SAEKHOU, A. M.; XIAO, L.; LAL, A. A. Testing the efficacy of a recombinant merozoite surface protein (MSP-1(19) of *Plasmodium vivax* in *Saimiri boliviensis* monkeys. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.60, n.3, p.350-356, 1999.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. **Cell**, v.124, n.4, p.755-766, 2006.

CREECH, C. B.; DEKKER, C. L.; HO, D.; PHILLIPS, S.; MACKAY, S.; MURRAY-KREZAN, C.; GRAZIA PAU, M.; HENDRIKS, J.; BROWN, V.; DALLY, L. G.; VERSTEEGE, I.; EDWARDS, K. M. Randomized, placebo-controlled trial to assess the safety and immunogenicity of an adenovirus type 35-based circumsporozoite malaria vaccine in healthy adults. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.9, n.12, p.2548-2557, 2013.

DABIRÉ, K. R.; DIABATÉ, A.; DJOGBENOU, L.; OUARI, A.; N'GUESSAN, R.; OUÉDRAOGO, J. B.; HOUGARD, J. M.; CHANDRE, F.; BALDET, T. Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. **Malar J.**, v.7, 2008.

DE BARRA, E.; HODGSON, S. H.; EWER, K. J.; BLISS, C. M.; HENNIGAN, K.; COLLINS, A.; BERRIE, E.; LAWRIE, A. M.; GILBERT, S. C.; NICOSIA, A.; MCCONKEY, S. J.; HILL, A. V. S. A Phase Ia Study to Assess the Safety and Immunogenicity of New Malaria Vaccine Candidates ChAd63 CS Administered Alone and with MVA CS. **PLOS ONE**, v.9, n.12, p.e115161, 2014.

DE CASSAN, S. C.; FORBES, E. K.; DOUGLAS, A. D.; MILICIC, A.; SINGH, B.; GUPTA, P.; CHAUHAN, V. S.; CHITNIS, C. E.; GILBERT, S. C.; HILL, A. V. S.; DRAPER, S. J. The Requirement for Potent Adjuvants To Enhance the Immunogenicity and Protective Efficacy of Protein Vaccines Can Be Overcome by Prior Immunization with a Recombinant Adenovirus. **J Immunol**, v.187, n.5, p.2602-2616, 2011.

DE CASSAN, S. C.; SHAKRI, A. R.; LLEWELLYN, D.; ELIAS, S. C.; CHO, J. S.; GOODMAN, A. L.; JIN, J.; DOUGLAS, A. D.; SUWANARUSK, R.; NOSTEN, F. H.; RÉNIA, L.; RUSSELL, B.; CHITNIS, C. E.; DRAPER, S. J. Preclinical Assessment of Viral Vectedored and Protein Vaccines Targeting the Duffy-Binding Protein Region II of *Plasmodium Vivax*. **Front Immunol**, v.6, p.348, 2015.

DECKER, M. D.; EDWARDS, K. M. ACELLULAR PERTUSSIS VACCINES. **Pediatric Clinics of North America**, v.47, n.2, p.309-335, 2000.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv**, v.27, n.3, p.297-306, 2009.

DEVI, Y. S.; MUKHERJEE, P.; YAZDANI, S. S.; SHAKRI, A. R.; MAZUMDAR, S.; PANDEY, S.; CHITNIS, C. E.; CHAUHAN, V. S. Immunogenicity of Plasmodium vivax combination subunit vaccine formulated with human compatible adjuvants in mice. **Vaccine**, v.25, n.28, p.5166-5174, 2007.

DOERIG, C.; RAYNER, J. C.; SCHERF, A.; TOBIN, A. B. Post-translational protein modifications in malaria parasites. **Nat Rev Micro**, v.13, n.3, p.160-172, 2015.

DOOLAN, D. L.; MARTINEZ-ALIER, N. Immune Response to Pre-Erythrocytic Stages of Malaria Parasites. **Curr. Mol. Med.**, v.6, n.2, p.169-185, 2006.

DUTTA, S.; DAUGHERTY, J. R.; WARE, L. A.; LANAR, D. E.; OCKENHOUSE, C. F. Expression, purification and characterization of a functional region of the Plasmodium vivax Duffy binding protein. **Mol Biochem Parasitol**, v.109, n.2, p.179-184, 2000.

DUTTA, S.; WARE, L. A.; BARBOSA, A.; OCKENHOUSE, C. F.; LANAR, D. E. Purification, Characterization, and Immunogenicity of a Disulfide Cross-Linked Plasmodium vivax Vaccine Candidate Antigen, Merozoite Surface Protein 1, Expressed in Escherichia coli. **Infect Immun**, v.69, n.9, p.5464-5470, 2001.

EBRAHIMI, S. M.; TEBIANIAN, M. Role of Mycobacterial Heat Shock Protein 70 (mHSP70) as Genetic Vaccine Adjuvants. **World Applied Sciences Journal**, v.14, p.1569-1575, 2011.

EJGIRI, I.; RAGHEB, D. R. T.; PINO, P.; COPPI, A.; BENNETT, B. L.; SOLDATI-FAVRE, D.; SINNIS, P. Shedding of TRAP by a Rhomboid Protease from the Malaria Sporozoite Surface Is Essential for Gliding Motility and Sporozoite Infectivity. **PLoS Pathog**, v.8, n.7, p.e1002725, 2012.

ELIAS, S. C.; CHOUDHARY, P.; DE CASSAN, S. C.; BISWAS, S.; COLLINS, K. A.; HALSTEAD, F. D.; BLISS, C. M.; EWER, K. J.; HODGSON, S. H.; DUNCAN, C. J. A.; HILL, A. V. S.; DRAPER, S. J. Analysis of human B-cell responses following ChAd63-MVA MSP1 and AMA1 immunization and controlled malaria infection. **Immunology**, v.141, n.4, p.628-644, 2014.

ELIAS, S. C.; COLLINS, K. A.; HALSTEAD, F. D.; CHOUDHARY, P.; BLISS, C. M.; EWER, K. J.; SHEEHY, S. H.; DUNCAN, C. J. A.; BISWAS, S.; HILL, A. V. S.; DRAPER, S. J. Assessment of Immune Interference, Antagonism, and Diversion following Human Immunization with Biallelic Blood-Stage Malaria Viral-Vectored Vaccines and Controlled Malaria Infection. **The Journal of Immunology**, v.190, n.3, p.1135, 2013.

EWER, K. J.; O'HARA, G. A.; DUNCAN, C. J. A.; COLLINS, K. A.; SHEEHY, S. H.; REYES-SANDOVAL, A.; GOODMAN, A. L.; EDWARDS, N. J.; ELIAS, S. C.; HALSTEAD, F. D.; LONGLEY, R. J.; ROWLAND, R.; POULTON, I. D.; DRAPER, S. J.; BLAGBOROUGH, A. M.; BERRIE, E.; MOYLE, S.; WILLIAMS, N.; SIANI, L.; FOLGORI, A.; COLLOCA, S.; SINDEN, R. E.; LAWRIE, A. M.; CORTESE, R.; GILBERT, S. C.; NICOSIA, A.; HILL, A. V. S. Protective CD8(+) T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation. **Nature Communications**, v.4, p.2836, 2013.

FERREIRA, A.; SCHOFIELD, L.; ENEA, V.; SCHELLEKENS, H.; VAN DER MEIDE, P.; COLLINS, W. E.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V. Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon. **Science**, v.232, n.4752, p.881, 1986.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal**, v.15, p.284, 2016.

FOURNILLIER, A.; FRELIN, L.; JACQUIER, E.; AHLÉN, G.; BRASS, A.; GEROSIER, E.; HOLMSTRÖM, F.; BRODERICK, K. E.; SARDESAI, N. Y.; BONNEFOY, J.-Y.; INCHAUSPÉ, G.; SÄLLBERG, M. A Heterologous Prime/Boost Vaccination Strategy Enhances the Immunogenicity of Therapeutic Vaccines for Hepatitis C Virus. **Int J Infect Dis** v.208, n.6, p.1008-1019, 2013.

FRAHM, N.; DECAMP, A. C.; FRIEDRICH, D. P.; CARTER, D. K.; DEFAWE, O. D.; KUBLIN, J. G.; CASIMIRO, D. R.; DUERR, A.; ROBERTSON, M. N.; BUCHBINDER, S. P.; HUANG, Y.; SPIES, G. A.; ROSA, S. C. D.; MCEL RATH, M. J. Human adenovirus-specific T cells

modulate HIV-specific T cell responses to an Ad5-vectored HIV-1 vaccine. **J Clin Invest**, v.122, n.1, p.359-367, 2012.

FRASER, T.; MICHON, P.; BARNWELL, J. W.; NOE, A. R.; AL-YAMAN, F.; KASLOW, D. C.; ADAMS, J. H. Expression and serologic activity of a soluble recombinant *Plasmodium vivax* Duffy binding protein. **Infect Immun.**, v.65, n.7, p.2772-7, 1997.

FREVERT, U.; SINNIS, P.; CERAMI, C.; SHREFFLER, W.; TAKACS, B.; NUSSENZWEIG, V. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. **J Exp Med**, v.177, n.5, p.1287-1298, 1993.

GAMA, B. E.; LACERDA, M. V. G.; DANIEL-RIBEIRO, C. T.; FERREIRA-DA-CRUZ, M. D. F. Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.106, p.159-166, 2011.

GHOSH, A. K.; DEVENPORT, M.; JETHWANNEY, D.; KALUME, D. E.; PANDEY, A.; ANDERSON, V. E.; SULTAN, A. A.; KUMAR, N.; JACOBS-LORENA, M. Malaria Parasite Invasion of the Mosquito Salivary Gland Requires Interaction between the *Plasmodium* TRAP and the Anopheles Saglin Proteins. **PLoS Pathog**, v.5, n.1, p.e1000265, 2009.

GONZÁLEZ-ASEGUINOLAZA, G.; NAKAYA, Y.; MOLANO, A.; DY, E.; ESTEBAN, M.; RODRÍGUEZ, D.; RODRÍGUEZ, J. R.; PALESE, P.; GARCÍA-SASTRE, A.; NUSSENZWEIG, R. S. Induction of Protective Immunity against Malaria by Priming-Boosting Immunization with Recombinant Cold-Adapted Influenza and Modified Vaccinia Ankara Viruses Expressing a CD8⁺-T-Cell Epitope Derived from the Circumsporozoite Protein of *Plasmodium yoelii*. **Virol J**, v.77, n.21, p.11859-11866, 2003.

GRAHAM, F. L.; SMILEY, J.; RUSSELL, W. C.; NAIRN, R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. **J. Gen. Virol**, v.36, n.1, p.59-72, 1977.

HAMILTON FAIRLEY, B. N. Sidelights on malaria in man obtained by subinoculation experiments. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.40, n.5, p.621-676, 1947.

HARINI, P. A.; KUMAR, H. A.; PRAVEEN, K.; SHIVAKUMAR, N. An Overview of Immunologic Adjuvants - A Review. **Journal of Vaccines & Vaccination**, n.4, p.167, 2013.

HAY, S. I.; SINKA, M. E.; OKARA, R. M.; KABARIA, C. W.; MBITHI, P. M.; TAGO, C. C.; BENZ, D.; GETHING, P. W.; HOWES, R. E.; PATIL, A. P.; TEMPERLEY, W. H.; BANGS, M. J.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.; ELYAZAR, I. R. F.; HARBACH, R. E.; HEMINGWAY, J.; MANGUIN, S.; MBOGO, C. M.; RUBIO-PALIS, Y.; GODFRAY, H. C. J. Developing Global Maps of the Dominant Anopheles Vectors of Human Malaria. **PLoS Medicine**, v.7, n.2, p.e1000209, 2010.

HEALER, J.; CRAWFORD, S.; RALPH, S.; MCFADDEN, G.; COWMAN, A. F. Independent Translocation of Two Micronemal Proteins in Developing *Plasmodium falciparum* Merozoites. **Infect Immun**, v.70, n.10, p.5751-5758, 2002.

HERRERA, S.; FERNÁNDEZ, O. L.; 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. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.84, n.Suppl 2, p.12-20, 2011.

HILL, A. V. S. Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. **Nat Rev Immunol**, v.6, n.1, p.21-32, 2006.

HILL, A. V. S. Vaccines against malaria. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.366, n.1579, p.2806-2814, 2011.

HISAEDA, H.; STOWERS, A.; TSUBOI, T.; COLLINS, W.; SATTABONGKOT, J.; SUWANABUN, N.; TORII, M.; KASLOW, D. Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. **Infect Immun**, v.68, p.6618 - 6623, 2000.

HISAEDA, H.; YASUTOMO, K.; HIMENO, K. Malaria: immune evasion by parasites. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, n.4, p.700-706, 2005.

HODDER, A. N.; CREWETHER, P. E.; ANDERS, R. F. Specificity of the Protective Antibody Response to Apical Membrane Antigen 1. **Infect Immun**, v.69, n.5, p.3286-3294, 2001.

HODGSON, S. H.; EWER, K. J.; BLISS, C. M.; EDWARDS, N. J.; RAMPLING, T.; ANAGNOSTOU, N. A.; DE BARRA, E.; HAVELOCK, T.; BOWYER, G.; POULTON, I. D.; DE CASSAN, S.; LONGLEY, R.; ILLINGWORTH, J. J.; DOUGLAS, A. D.; MANGE, P. B.; COLLINS, K. A.; ROBERTS, R.; GERRY, S.; BERRIE, E.; MOYLE, S.; COLLOCA, S.; CORTESE, R.; SINDEN, R. E.; GILBERT, S. C.; BEJON, P.; LAWRIE, A. M.; NICOSIA, A.; FAUST, S. N.; HILL, A. V. S. Evaluation of the Efficacy of ChAd63-MVA Vected Vaccines Expressing Circumsporozoite Protein and ME-TRAP Against Controlled Human Malaria Infection in Malaria-Naive Individuals. **The Journal of Infectious Diseases**, v.211, n.7, p.1076-1086, 2015.

HOLDER, A. A.; BLACKMAN, M. J. What is the function of MSP-I on the malaria merozoite? **Parasitology Today**, v.10, n.5, p.182-184, 1994.

HOLLINGDALE, M. R.; SEDEGAH, M.; LIMBACH, K. Development of replication-deficient adenovirus malaria vaccines. **Expert Rev Vaccines**, v.16, n.3, p.261-271, 2017.

HORUK, R.; CHITNIS, C. E.; DARBONNE, W. C.; COLBY, T. J.; RYBICKI, A.; HADLEY, T. J.; MILLER, L. H. A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor. **Science**, v.261, n.5125, p.1182-1184, 1993.

HOWELL, D. P. G.; SAMUDRALA, R.; SMITH, J. D. Disguising itself- insights into Plasmodium falciparum binding and immune evasion from the DBL crystal structure. **Mol Biochem Parasitol**, v.148, n.1, p.1-9, 2006.

HU SL; ABRAMS K; BARBER GN; MORAN P; ZARLING JM; LANGLOIS AJ; KULLER L; MORTON WR; RE, B. Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. **Science**, v.255, p.456-459, 1992.

IMLER, J.-L. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. **Vaccine**, v.13, n.13, p.1143-1151, 1995.

KANO, F. S.; SANCHEZ, B. A. M.; SOUSA, T. N.; TANG, M. L.; SALIBA, J.; OLIVEIRA, F. M.; NOGUEIRA, P. A.; GONÇALVES, A. Q.; FONTES, C. J. F.; SOARES, I. S.; BRITO, C. F. A.; ROCHA, R. S.; CARVALHO, L. H. Plasmodium vivax Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. **Trop Med Int Health**, v.17, n.8, p.989-1000, 2012.

KANTELE, A.; JOKIRANTA, T. S. Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. **Clin Infect Dis**, v.52, n.11, p.1356-1362, 2011.

KAPPE, S. H. I.; NOE, A. R.; FRASER, T. S.; BLAIR, P. L.; ADAMS, J. H. A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.3, p.1230-1235, 1998.

KARIU, T.; YUDA, M.; YANO, K.; CHINZEI, Y. MAEBL Is Essential for Malarial Sporozoite Infection of the Mosquito Salivary Gland. **J Exp Med**, v.195, n.10, p.1317-1323, 2002.

KASEHAGEN, L. J.; MUELLER, I.; KINIBORO, B.; BOCKARIE, M. J.; REEDER, J. C.; KAZURA, J. W.; KASTENS, W.; MCNAMARA, D. T.; KING, C. H.; WHALEN, C. C.; ZIMMERMAN, P. A. Reduced *Plasmodium vivax* Erythrocyte Infection in PNG Duffy-Negative Heterozygotes. **PLoS ONE**, v.2, n.3, p.e336, 2007.

KASLOW, D. C. Transmission-blocking vaccines: Uses and current status of development. **Int J Parasitol Parasites**, v.27, n.2, p.183-189, 1997.

KEBAIER, C.; VOZA, T.; VANDERBERG, J. Kinetics of Mosquito-Injected *Plasmodium* Sporozoites in Mice: Fewer Sporozoites Are Injected into Sporozoite-Immunized Mice. **PLoS Pathog**, v.5, n.4, p.e1000399, 2009.

KIMANI, D.; JAGNE, Y. J.; COX, M.; KIMANI, E.; BLISS, C. M.; GITAU, E.; OGWANG, C.; AFOLABI, M. O.; BOWYER, G.; COLLINS, K. A.; EDWARDS, N.; HODGSON, S. H.; DUNCAN, C. J. A.; SPENCER, A. J.; KNIGHT, M. G.; DRAMMEH, A.; ANAGNOSTOU, N. A.; BERRIE, E.; MOYLE, S.; GILBERT, S. C.; SOIPEI, P.; OKEBE, J.; COLLOCA, S.; CORTESE, R.; VIEBIG, N. K.; ROBERTS, R.; LAWRIE, A. M.; NICOSIA, A.; IMOUKHUEDE, E. B.; BEJON, P.; CHILENGI, R.; BOJANG, K.; FLANAGAN, K. L.; HILL, A. V. S.; URBAN, B. C.; EWER, K. J. Translating the Immunogenicity of Prime-boost Immunization With ChAd63 and MVA ME-TRAP From Malaria Naive to Malaria-endemic Populations. **Molecular Therapy**, v.22, n.11, p.1992-2003, 2014.

KING, C. L.; MICHON, P.; SHAKRI, A. R.; MARCOTTY, A.; STANISIC, D.; ZIMMERMAN, P. A.; COLE-TOBIAN, J. L.; MUELLER, I.; CHITNIS, C. E. Naturally acquired Duffy-binding protein-specific binding inhibitory antibodies confer protection from blood-stage *Plasmodium vivax* infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.105, n.24, p.8363-8368, 2008.

KROTOSKI, W. A.; COLLINS, W. E.; BRAY, R. S.; GARNHAM, P. C. C.; COGSWELL, F. B.; GWADZ, R. W.; KILLICK-KENDRICK, R.; WOLF, R.; SINDEN, R.; KOONTZ, L. C.; STANFILL, P. S. Demonstration of Hypnozoites in Sporozoite-Transmitted Plasmodium vivax Infection*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.31, n.6, p.1291-1293, 1982.

LEITE, J. A.; BARGIERI, D. Y.; CARVALHO, B. O.; ALBRECHT, L.; LOPES, S. C. P.; KAYANO, A. C. A. V.; FARIAS, A. S.; CHIA, W. N.; CLASER, C.; MALLERET, B.; RUSSELL, B.; CASTIÑEIRAS, C.; SANTOS, L. M. B.; BROCCHI, M.; WUNDERLICH, G.; SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M.; RÉNIA, L.; COSTA, F. T. M. Immunization with the MAEBL M2 Domain Protects against Lethal Plasmodium yoelii Infection. **Infect Immun**, v.83, n.10, p.3781-3792, 2015.

LI, S.; RODRIGUES, M.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; PALESE, P.; NUSSENZWEIG, R. S.; ZAVALA, F. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, n.11, p.5214-5218, 1993.

LIMBACH, K. J.; RICHIE, T. L. Viral vectors in malaria vaccine development. **Parasite Immunol**, v.31, n.9, p.501-519, 2009.

LUMSDEN, J. M.; NURMUKHAMBETOVA, S.; KLEIN, J. H.; SATTABONGKOT, J.; BENNETT, J. W.; BERTHOLET, S.; FOX, C. B.; REED, S. G.; OCKENHOUSE, C. F.; HOWARD, R. F.; POLHEMUS, M. E.; YADAVA, A. Evaluation of immune responses to a Plasmodium vivax CSP-based recombinant protein vaccine candidate in combination with second-generation adjuvants in mice. **Vaccine**, v.30, n.22, p.3311-3319, 2012.

MALARIA_VACCINE_FUNDERS_GROUP. **The Malaria Vaccine Technology Roadmap**. 2013

MALKIN, E. M.; DURBIN, A. P.; DIEMERT, D. J.; SATTABONGKOT, J.; WU, Y.; MIURA, K.; LONG, C. A.; LAMBERT, L.; MILES, A. P.; WANG, J.; STOWERS, A.; MILLER, L. H.; SAUL, A. Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for Plasmodium vivax malaria. **Vaccine**, v.23, n.24, p.3131-3138, 2005.

MARKUS, M. Malaria: Origin of the Term “Hypnozoite”. **J. Hist. Biol**, v.44, n.4, p.781-786, 2011.

- MARSH, K.; KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunol**, v.28, n.1-2, p.51-60, 2006.
- MARTINEZ, C.; MARZEC, T.; SMITH, C. D.; TELL, L. A.; SEHGAL, R. N. M. Identification and expression of maeb1, an erythrocyte-binding gene, in *Plasmodium gallinaceum*. **Parasitology research**, v.112, n.3, p.945-954, 2013.
- MATHIAS, D. K.; PLIESKATT, J. L.; ARMISTEAD, J. S.; BETHONY, J. M.; ABDUL-MAJID, K. B.; MCMILLAN, A.; ANGOV, E.; ARYEE, M. J.; ZHAN, B.; GILLESPIE, P.; KEEGAN, B.; JARIWALA, A. R.; REZENDE, W.; BOTTAZZI, M. E.; SCORPIO, D. G.; HOTEZ, P. J.; DINGLASAN, R. R. Expression, Immunogenicity, Histopathology, and Potency of a Mosquito-Based Malaria Transmission-Blocking Recombinant Vaccine. **Infect Immun**, v.80, n.4, p.1606-1614, 2012.
- MCALEER, W. J.; BUYNAK, E. B.; MAIGETTER, R. Z.; WAMPLER, D. E.; MILLER, W. J.; HILLEMANN, M. R. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. **Nature**, v.307, n.5947, p.178-180, 1984.
- MCCONNELL, M. J.; HANNA, P. C.; IMPERIALE, M. J. Adenovirus-based Prime-boost Immunization for Rapid Vaccination Against Anthrax. **Mol Ther**, v.15, n.1, p.203-210, 2007.
- MCGRORY, W. J.; BAUTISTA, D. S.; GRAHAM, F. L. A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. **Virology**, v.163, n.2, p.614-617, 1988.
- MCSORLEY, S. J.; EHST, B. D.; YU, Y.; GEWIRTZ, A. T. Bacterial Flagellin Is an Effective Adjuvant for CD4⁺ T Cells In Vivo. **The Journal of Immunology**, v.169, n.7, p.3914, 2002.
- MENARD, D.; CHAN, E. R.; BENEDET, C.; RATSIMBASOA, A.; KIM, S.; CHIM, P.; DO, C.; WITKOWSKI, B.; DURAND, R.; THELLIER, M.; SEVERINI, C.; LEGRAND, E.; MUSSET, L.; NOUR, B. Y. M.; MERCEREAU-PIUJALON, O.; SERRE, D.; ZIMMERMAN, P. A. Whole Genome Sequencing of Field Isolates Reveals a Common Duplication of the Duffy Binding Protein Gene in Malagasy *Plasmodium vivax* Strains. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7, n.11, p.e2489, 2013.

MENARD, R.; TAVARES, J.; COCKBURN, I.; MARKUS, M.; ZAVALA, F.; AMINO, R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. **Nat Rev Micro**, v.11, n.10, p.701-712, 2013.

MICHEL, K.; KAFATOS, F. C. Mosquito immunity against Plasmodium. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.35, n.7, p.677-689, 2005.

MICHON, P.; FRASER, T.; ADAMS, J. Naturally acquired and vaccine-elicited antibodies block erythrocyte cytoadherence of the Plasmodium vivax Duffy binding protein. **Infect Immun**, v.68, p.3164 - 3171, 2000.

MICHON, P. A.; AREVALO-HERRERA, M.; FRASER, T.; HERRERA, S.; ADAMS, J. H. Serologic responses to recombinant Plasmodium vivax Duffy binding protein in a Colombian village. **Am J Trop Med Hyg**, v.59, 1998.

MILLER, L.; MCAULIFFE, F.; MASON, S. Erythrocyte receptor for malaria merozoites. **Am J Trop Med Hyg**, v.26, p.204 - 208, 1977.

MILLER, L. H.; MASON, S. J.; CLYDE, D. F.; MCGINNIS, M. H. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy blood group genotype, FyFy. **N Engl J Med**, v.295, n.6, p.302-304, 1976.

MITCHELL, G. H.; THOMAS, A. W.; MARGOS, G.; DLUZIEWSKI, A. R.; BANNISTER, L. H. Apical Membrane Antigen 1, a Major Malaria Vaccine Candidate, Mediates the Close Attachment of Invasive Merozoites to Host Red Blood Cells. **Infect Immun**, v.72, n.1, p.154-158, 2004.

MORENO, A.; CARO-AGUILAR, I.; YAZDANI, S. S.; SHAKRI, A. R.; LAPP, S.; STROBERT, E.; MCCLURE, H.; CHITNIS, C. E.; GALINSKI, M. R. Preclinical assessment of the receptor-binding domain of Plasmodium vivax Duffy-binding protein as a vaccine candidate in rhesus macaques. **Vaccine**, v.26, n.34, p.4338-4344, 2008.

MOTA, M. M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J. P.; HAFALLA, J. C. R.; FREVERT, U.; NUSSENZWEIG, R. S.; NUSSENZWEIG, V.; RODRÍGUEZ, A. Migration of Plasmodium Sporozoites Through Cells Before Infection. **Science**, v.291, n.5501, p.141, 2001.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; KOCHAR, D. K.; ALONSO, P. L.; DEL PORTILLO, H. A. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. **Lancet Infect Dis**, v.9, n.9, p.555-566, 2009.

MUELLER, I.; SHAKRI, A. R.; CHITNIS, C. E. Development of vaccines for *Plasmodium vivax* malaria. **Vaccine**, v.33, n.52, p.7489-7495, 2015.

NEMEROW, G. R.; PACHE, L.; REDDY, V.; STEWART, P. L. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. **Virology**, v.384, n.2, p.380-388, 2009.

NOE, A. R.; ADAMS, J. H. *Plasmodium yoelii* YM MAEBL protein is coexpressed and colocalizes with rhoptry proteins. **Mol Biochem Parasitol**, v.96, n.1-2, p.27-35, 1998.

NTUMNGIA, F. B.; ADAMS, J. H. Design and Immunogenicity of a Novel Synthetic Antigen Based on the Ligand Domain of the *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein. **Clin Vaccine Immunol.**, v.19, n.1, p.30-36, 2012.

NUSSENZWEIG, R. S.; 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.

O'HARA, G. A.; DUNCAN, C. J. A.; EWER, K. J.; COLLINS, K. A.; ELIAS, S. C.; HALSTEAD, F. D.; GOODMAN, A. L.; EDWARDS, N. J.; REYES-SANDOVAL, A.; BIRD, P.; ROWLAND, R.; SHEEHY, S. H.; POULTON, I. D.; HUTCHINGS, C.; TODRYK, S.; ANDREWS, L.; FOLGORI, A.; BERRIE, E.; MOYLE, S.; NICOSIA, A.; COLLOCA, S.; CORTESE, R.; SIANI, L.; LAWRIE, A. M.; GILBERT, S. C.; HILL, A. V. S. Clinical Assessment of a Recombinant Simian Adenovirus ChAd63: A Potent New Vaccine Vector. **The Journal of Infectious Diseases**, v.205, n.5, p.772-781, 2012.

OCKENHOUSE, C. F.; REGULES, J.; TOSH, D.; COWDEN, J.; KATHCART, A.; CUMMINGS, J.; PAOLINO, K.; MOON, J.; KOMISAR, J.; KAMAU, E.; OLIVER, T.; CHHOEU, A.; MURPHY, J.; LYKE, K.; LAURENS, M.; BIRKETT, A.; LEE, C.; WELTZIN, R.; WILLE-REECE, U.; SEDEGAH, M.; HENDRIKS, J.; VERSTEEGE, I.; PAU, M. G.; SADOFF, J.; VANLOUBBEECK, Y.; LIEVENS, M.; HEERWEGH, D.; MORIS, P.; GUERRA MENDOZA, Y.; JONGERT, E.; COHEN, J.; VOSS, G.; BALLOU, W. R.; VEKEMANS, J. Ad35.CS.01 - RTS,S/AS01 Heterologous Prime Boost Vaccine Efficacy against Sporozoite Challenge in Healthy Malaria-Naïve Adults. **PLoS ONE**, v.10, n.7, p.e0131571, 2015.

OGWANG, C.; AFOLABI, M.; KIMANI, D.; JAGNE, Y. J.; SHEEHY, S. H.; BLISS, C. M.; DUNCAN, C. J. A.; COLLINS, K. A.; GARCIA KNIGHT, M. A.; KIMANI, E.; ANAGNOSTOU, N. A.; BERRIE, E.;

MOYLE, S.; GILBERT, S. C.; SPENCER, A. J.; SOIPEI, P.; MUELLER, J.; OKEBE, J.; COLLOCA, S.; CORTESE, R.; VIEBIG, N. K.; ROBERTS, R.; GANTLETT, K.; LAWRIE, A. M.; NICOSIA, A.; IMOUKHUEDE, E. B.; BEJON, P.; URBAN, B. C.; FLANAGAN, K. L.; EWER, K. J.; CHILENGI, R.; HILL, A. V. S.; BOJANG, K. Safety and Immunogenicity of Heterologous Prime-Boost Immunisation with Plasmodium falciparum Malaria Candidate Vaccines, ChAd63 ME-TRAP and MVA ME-TRAP, in Healthy Gambian and Kenyan Adults. **PLOS ONE**, v.8, n.3, p.e57726, 2013.

OGWANG, C.; KIMANI, D.; EDWARDS, N. J.; ROBERTS, R.; MWACHARO, J.; BOWYER, G.; BLISS, C.; HODGSON, S. H.; NJUGUNA, P.; VIEBIG, N. K.; NICOSIA, A.; GITAU, E.; DOUGLAS, S.; ILLINGWORTH, J.; MARSH, K.; LAWRIE, A.; IMOUKHUEDE, E. B.; EWER, K.; URBAN, B. C.; HILL, A. V. S.; BEJON, P.; THE, M. G. Prime-boost vaccination with chimpanzee adenovirus and modified vaccinia Ankara encoding TRAP provides partial protection against Plasmodium falciparum infection in Kenyan adults. **Science translational medicine**, v.7, n.286, p.286re5-286re5, 2015.

OMS. Action and Investment to defeat Malaria 2016-2030. For a Malaria-Free World 2016a

OMS. **Elimating Malaria** World Health Organization. Geneve. 2016b

OMS. **The World Malaria Report 2016**. World Health Organization. Geneve. 2016c

OUÉDRAOGO, A.; TIONO, A. B.; KARGOUGOU, D.; YARO, J. B.; OUÉDRAOGO, E.; KABORÉ, Y.; KANGOYE, D.; BOUGOUMA, E. C.; GANSANE, A.; HENRI, N.; DIARRA, A.; SANON, S.; SOULAMA, I.; KONATE, A. T.; WATSON, N. L.; BROWN, V.; HENDRIKS, J.; PAU, M. G.; VERSTEEGE, I.; WIESKEN, E.; SADOFF, J.; NEBIE, I.; SIRIMA, S. B. A Phase 1b Randomized, Controlled, Double-Blinded Dosage-Escalation Trial to Evaluate the Safety, Reactogenicity and Immunogenicity of an Adenovirus Type 35 Based Circumsporozoite Malaria Vaccine in Burkinabe Healthy Adults 18 to 45 Years of Age. **PLOS ONE**, v.8, n.11, p.e78679, 2013.

PAN, W.; HUANG, D.; ZHANG, Q.; QU, L.; ZHANG, D.; ZHANG, X.; XUE, X.; QIAN, F. Fusion of Two Malaria Vaccine Candidate Antigens Enhances Product Yield, Immunogenicity, and Antibody-Mediated Inhibition of Parasite Growth In Vitro. **J Immunol**, v.172, n.10, p.6167, 2004.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. **Immunol Cell Biol**, v.82, n.5, p.488-496, 2004.

PINE, S. O.; KUBLIN, J. G.; HAMMER, S. M.; BORGERDING, J.; HUANG, Y.; CASIMIRO, D. R.; MCEL RATH, M. J. Pre-Existing Adenovirus Immunity Modifies a Complex Mixed Th1 and Th2 Cytokine Response to an Ad5/HIV-1 Vaccine Candidate in Humans. **PLoS ONE**, v.6, n.4, p.e18526, 2011.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: past, present and future. **Nat Med**, 2005.

PRADEL, G.; FREVERT, U. Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. **Hepatology**, v.33, n.5, p.1154-1165, 2001.

PRADEL, G.; GARAPATY, S.; FREVERT, U. Kupffer and stellate cell proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. **Comparative Hepatology**, v.3, n.Suppl 1, p.S47-S47, 2004.

PREISER, P.; KAVIRATNE, M.; KHAN, S.; BANNISTER, L.; JARRA, W. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. **Microbes Infect** v.2, n.12, p.1461-1477, 2000.

PREISER, P.; RÉNIA, L.; SINGH, N.; BALU, B.; JARRA, W.; VOZA, T.; KANEKO, O.; BLAIR, P.; TORII, M.; LANDAU, I.; ADAMS, J. H. Antibodies against MAEBL Ligand Domains M1 and M2 Inhibit Sporozoite Development In Vitro. **Infect Immun**, v.72, n.6, p.3604-3608, 2004.

PRICE, R. N.; DOUGLAS, N. M.; ANSTEY, N. M. New developments in Plasmodium vivax malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. **Curr Opin Infect Dis**, v.22, n.5, p.430-435, 2009. [10.1097/QCO.0b013e32832f14c1](https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32832f14c1)

PRICE, R. N.; TJITRA, E.; GUERRA, C. A.; YEUNG, S.; WHITE, N. J.; ANSTEY, N. M. Vivax Malaria: Neglected and Not Benign. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v.77, n.6_Suppl, p.79-87, 2007.

PRIDY, F. H.; BROWN, D.; KUBLIN, J.; MONAHAN, K.; WRIGHT, D. P.; LALEZARI, J.; SANTIAGO, S.; MARMOR, M.; LALLY, M.; NOVAK, R. M.; BROWN, S. J.; KULKARNI, P.; DUBEY, S. A.; KIERSTEAD, L. S.; CASIMIRO, D. R.; MOGG, R.; DINUBILE, M. J.; SHIVER, J. W.; LEAVITT, R. Y.; ROBERTSON, M. N.; MEHROTRA, D. V.; QUIRK, E.; GROUPE, M. V.-S. Safety and Immunogenicity of a Replication-Incompetent

Adenovirus Type 5 HIV-1 Clade B gag/pol/nef Vaccine in Healthy Adults. **Clin Infect Dis**, v.46, n.11, p.1769-1781, 2008.

RAMPLING, T.; EWER, K. J.; BOWYER, G.; BLISS, C. M.; EDWARDS, N. J.; WRIGHT, D.; PAYNE, R. O.; VENKATRAMAN, N.; DE BARRA, E.; SNUDDEN, C. M.; POULTON, I. D.; DE GRAAF, H.; SUKHTANKAR, P.; ROBERTS, R.; IVINSON, K.; WELTZIN, R.; RAJKUMAR, B.-Y.; WILLE-REECE, U.; LEE, C. K.; OCKENHOUSE, C. F.; SINDEN, R. E.; GERRY, S.; LAWRIE, A. M.; VEKEMANS, J.; MORELLE, D.; LIEVENS, M.; BALLOU, R. W.; COOKE, G. S.; FAUST, S. N.; GILBERT, S.; HILL, A. V. S. Safety and High Level Efficacy of the Combination Malaria Vaccine Regimen of RTS,S/AS01(B) With Chimpanzee Adenovirus 63 and Modified Vaccinia Ankara Vected Vaccines Expressing ME-TRAP. **The Journal of Infectious Diseases**, v.214, n.5, p.772-781, 2016.

REDDY, V. S.; NATCHIAR, S. K.; STEWART, P. L.; NEMEROW, G. R. Crystal Structure of Human Adenovirus at 3.5 Å Resolution. **Science**, v.329, n.5995, p.1071-1075, 2010.

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

RENER, J.; CARTER, R.; ROSENBERG, Y.; MILLER, L. H. Anti-gamete monoclonal antibodies synergistically block transmission of malaria by preventing fertilization in the mosquito. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.77, n.11, p.6797-6799, 1980.

RIECKMANN, K. H.; BEAUDOIN, R. L.; CASSELLS, J. S.; SELL, K. W. Current considerations in vaccination of humans against malaria: Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. **Bull World Health Organ**, v.57, p.261-265, 1979.

RIEDEL, S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. **Proc (Bayl Univ Med Cent)**, v.18, n.1, p.21-25, 2005.

RILEY, E. M.; STEWART, V. A. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. **Nat Med**, v.19, n.2, p.168-178, 2013.

ROCHA, C. D.; CAETANO, B. C.; MACHADO, A. V.; BRUNAROMERO, O. Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. **Int Microbiol**, v.7, n.2, p.83-94, 2004.

ROSA, D. S.; IWAI, L. K.; TZELEPIS, F.; BARGIERI, D. Y.; MEDEIROS, M. A.; SOARES, I. S.; SIDNEY, J.; SETTE, A.; KALIL, J.; MELLO, L. E.; CUNHA-NETO, E.; RODRIGUES, M. M. Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP119 and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). **Microbes Infect**, v.8, n.8, p.2130-2137, 2006.

ROSENBERG, R.; WIRTZ, R. A.; 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.

RTS; SCTP. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. **Lancet**, v.386, n.9988, p.31-45, 2015.

RYAN, J. R.; STOUTE, J. A.; AMON, J.; DUNTON, R. F.; MTALIB, R.; KOROS, J.; OWOUR, B.; LUCKHART, S.; WIRTZ, R.; BARNWELL, J. W.; ROSENBERG, R. Evidence for transmission of *Plasmodium Vivax* among a Duffy Antigen Negative Population in Western Kenya. **Am J Trop Med Hyg**, v.75, n.4, p.575-581, 2006.

SABCHAREON, A.; BURNOUF, T.; OUATTARA, D.; ATTANATH, P.; BOUHAROUN-TAYOUN, H.; CHANTAVANICH, P.; FOUCAULT, C.; CHONGSUPHAJAISIDDHI, T.; DRUILHE, P. Parasitologic and Clinical Human Response to Immunoglobulin Administration in *Falciparum* Malaria. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v.45, n.3, p.297-308, 1991.

SACHDEVA, S.; AHMAD, G.; MALHOTRA, P.; MUKHERJEE, P.; CHAUHAN, V. S. Comparison of Immunogenicities of Recombinant *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 19- and 42-Kilodalton Fragments Expressed in *Escherichia coli*. **Infect Immun**, v.72, n.10, p.5775-5782, 2004.

SAUL, A.; HENSMANN, M.; SATTABONGKOT, J.; COLLINS, W. E.; BARNWELL, J. W.; LANGERMANS, J. A. M.; WU, Y.; LONG, C. A.; DUBOVSKY, F.; THOMAS, A. W. Immunogenicity in rhesus of the *Plasmodium vivax* mosquito stage antigen Pvs25H with Alhydrogel and Montanide ISA 720. **Parasite Immunol**, v.29, n.10, p.525-533, 2007.

SCHAGEN, F. H.; OSSEVOORT, M.; TOES, R. E.; HOEBEN, R. C. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a

review of strategies for evasion. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.50, n.1, p.51-70, 2004.

SCHNEIDER, J.; GILBERT, S. C.; BLANCHARD, T. J.; HANKE, T.; ROBSON, K. J.; HANNAN, C. M.; BECKER, M.; SINDEN, R.; SMITH, G. L.; HILL, A. V. S. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. **Nat Med**, v.4, n.4, p.397-402, 1998.

SCHOFIELD, L.; VILLAQUIRAN, J.; FERREIRA, A.; SCHELLEKENS, H.; NUSSENZWEIG, R.; NUSSENZWEIG, V. [gamma] Interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. **Nature**, v.330, n.6149, p.664-666, 1987.

SCHULDT, N. J.; AMALFITANO, A. Malaria vaccines: Focus on adenovirus based vectors. **Vaccine**, v.30, n.35, p.5191-5198, 2012.

SEDEGAH, M.; HOLLINGDALE, M. R.; FAROOQ, F.; GANESHAN, H.; BELMONTE, M.; KIM, Y.; PETERS, B.; SETTE, A.; HUANG, J.; MCGRATH, S.; ABOT, E.; LIMBACH, K.; SHI, M.; SOISSON, L.; DIGGS, C.; CHUANG, I.; TAMMINGA, C.; EPSTEIN, J. E.; VILLASANTE, E.; RICHIE, T. L. Sterile Immunity to Malaria after DNA Prime/Adenovirus Boost Immunization Is Associated with Effector Memory CD8+T Cells Targeting AMA1 Class I Epitopes. **PLOS ONE**, v.9, n.9, p.e106241, 2014.

SEDEGAH, M.; TAMMINGA, C.; MCGRATH, S.; HOUSE, B.; GANESHAN, H.; LEJANO, J.; ABOT, E.; BANANIA, G. J.; SAYO, R.; FAROOQ, F.; BELMONTE, M.; MANOHAR, N.; RICHIE, N. O.; WOOD, C.; LONG, C. A.; REGIS, D.; WILLIAMS, F. T.; SHI, M.; CHUANG, I.; SPRING, M.; EPSTEIN, J. E.; MENDOZA-SILVEIRAS, J.; LIMBACH, K.; PATTERSON, N. B.; BRUDER, J. T.; DOOLAN, D. L.; KING, C. R.; SOISSON, L.; DIGGS, C.; CARUCCI, D.; DUTTA, S.; HOLLINGDALE, M. R.; OCKENHOUSE, C. F.; RICHIE, T. L. Adenovirus 5-Vectored P. falciparum Vaccine Expressing CSP and AMA1. Part A: Safety and Immunogenicity in Seronegative Adults. **PLOS ONE**, v.6, n.10, p.e24586, 2011.

SEVERINI, C.; MENEGON, M. Resistance to antimalarial drugs: An endless world war against Plasmodium that we risk losing. **J Glob Antimicrob Resist**, v.3, n.2, p.58-63, 2015.

SHEEHY, S. H.; DUNCAN, C. J. A.; ELIAS, S. C.; BISWAS, S.; COLLINS, K. A.; O'HARA, G. A.; HALSTEAD, F. D.; EWER, K. J.; MAHUNGU, T.;

SPENCER, A. J.; MIURA, K.; POULTON, I. D.; DICKS, M. D. J.; EDWARDS, N. J.; BERRIE, E.; MOYLE, S.; COLLOCA, S.; CORTESE, R.; GANTLETT, K.; LONG, C. A.; LAWRIE, A. M.; GILBERT, S. C.; DOHERTY, T.; NICOSIA, A.; HILL, A. V. S.; DRAPER, S. J. Phase Ia Clinical Evaluation of the Safety and Immunogenicity of the Plasmodium falciparum Blood-Stage Antigen AMA1 in ChAd63 and MVA Vaccine Vectors. **PLOS ONE**, v.7, n.2, p.e31208, 2012a.

SHEEHY, S. H.; DUNCAN, C. J. A.; ELIAS, S. C.; CHOUDHARY, P.; BISWAS, S.; HALSTEAD, F. D.; COLLINS, K. A.; EDWARDS, N. J.; DOUGLAS, A. D.; ANAGNOSTOU, N. A.; EWER, K. J.; HAVELOCK, T.; MAHUNGU, T.; BLISS, C. M.; MIURA, K.; POULTON, I. D.; LILLIE, P. J.; ANTROBUS, R. D.; BERRIE, E.; MOYLE, S.; GANTLETT, K.; COLLOCA, S.; CORTESE, R.; LONG, C. A.; SINDEN, R. E.; GILBERT, S. C.; LAWRIE, A. M.; DOHERTY, T.; FAUST, S. N.; NICOSIA, A.; HILL, A. V. S.; DRAPER, S. J. ChAd63-MVA–vectored Blood-stage Malaria Vaccines Targeting MSP1 and AMA1: Assessment of Efficacy Against Mosquito Bite Challenge in Humans. **Molecular Therapy**, v.20, n.12, p.2355-2368, 2012b.

SIDJANSKI, S.; VANDERBERG, J. P. Delayed Migration of Plasmodium Sporozoites from the Mosquito Bite Site to the Blood. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.57, n.4, p.426-429, 1997.

SILVIE, O.; FRANETICH, J.-F.; CHARRIN, S.; MUELLER, M. S.; SIAU, A.; BODESCOT, M.; RUBINSTEIN, E.; HANNOUN, L.; CHAROENVIT, Y.; KOCKEN, C. H.; THOMAS, A. W.; VAN GEMERT, G.-J.; SAUERWEIN, R. W.; BLACKMAN, M. J.; ANDERS, R. F.; PLUSCHKE, G.; MAZIER, D. A Role for Apical Membrane Antigen 1 during Invasion of Hepatocytes by Plasmodium falciparum Sporozoites. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.10, p.9490-9496, 2004.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. Advances in vaccine adjuvants. **Nat Biotech.**, v.17, n.11, p.1075-1081, 1999.

SINGH, S.; SINGH, A.; PANDEY, S.; YAZDANI, S.; CHITNIS, C.; SHARMA, A. Definition of structural elements in Plasmodium vivax and P. knowlesi Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. **Biochem J**, v.374, p.193 - 198, 2003.

SINGH, S. K.; HORA, R.; BELRHALI, H.; CHITNIS, C. E.; SHARMA, A. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy-binding-like domain. **Nature**, v.439, n.7077, p.741-744, 2006.

SINKA, M. E.; BANGS, M. J.; MANGUIN, S.; RUBIO-PALIS, Y.; CHAREONVIRIYAPHAP, T.; COETZEE, M.; MBOGO, C. M.; HEMINGWAY, J.; PATIL, A. P.; TEMPERLEY, W. H.; GETHING, P. W.; KABARIA, C. W.; BURKOT, T. R.; HARBACH, R. E.; HAY, S. I. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites & Vectors**, v.5, n.1, p.69, 2012.

SMITH, T. A.; LEUENBERGER, R.; LENGELER, C. Child mortality and malaria transmission intensity in Africa. **Trends Parasitol**, v.17, n.3, p.145-149, 2001.

SOUSA, T. N.; CERÁVOLO, I. P.; FERNANDES FONTES, C. J.; COUTO, Á.; CARVALHO, L. H.; BRITO, C. F. A. The pattern of major polymorphisms in the Duffy binding protein ligand domain among *Plasmodium vivax* isolates from the Brazilian Amazon area. **Mol Biochem Parasitol**, v.146, n.2, p.251-254, 2006.

SOUSA, T. N.; TARAZONA-SANTOS, E. M.; WILSON, D. J.; MADUREIRA, A. P.; FALCÃO, P. R. K.; FONTES, C. J. F.; GIL, L. H. S.; FERREIRA, M. U.; CARVALHO, L. H.; BRITO, C. F. A. Genetic variability and natural selection at the ligand domain of the Duffy binding protein in Brazilian *Plasmodium vivax* populations. **Malar J**, v.9, 2010.

SOUZA-SILVA, F. A.; SILVA-NUNES, M. D.; SANCHEZ, B. A. M.; CERAVOLO, I. P.; MALAFRONTA, R. S.; BRITO, C. F. A.; FERREIRA, M. U.; CARVALHO, L. H. Naturally Acquired Antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein (DBP) in Rural Brazilian Amazon. **Am J Trop Med Hyg**, v.82, n.2, p.185-193, 2010.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J.-M.; MENARD, R.; HEUSSLER, V. T. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. **Science**, v.313, n.5791, p.1287, 2006.

TAMMINGA, C.; SEDEGAH, M.; MAIOLATESI, S.; FEDDERS, C.; REYES, S.; REYES, A.; VASQUEZ, C.; ALCORTA, Y.; CHUANG, I.; SPRING, M.; KAVANAUGH, M.; GANESHAN, H.; HUANG, J.; BELMONTE, M.; ABOT, E.; BELMONTE, A.; BANANIA, J.; FAROOQ, F.; MURPHY, J.; KOMISAR, J.; RICHIE, N. O.; BENNETT, J.; LIMBACH, K.; PATTERSON, N. B.; BRUDER, J. T.; SHI, M.; MILLER, E.; DUTTA, S.; DIGGS, C.; SOISSON, L. A.; HOLLINGDALE, M. R.; EPSTEIN, J. E.; RICHIE, T. L. Human adenovirus 5-vectored *Plasmodium falciparum* NMRC-M3V-Ad-PfCA vaccine encoding CSP and AMA1 is safe, well-

tolerated and immunogenic but does not protect against controlled human malaria infection. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v.9, n.10, p.2165-2177, 2013.

TATSIS, N.; ERTL, H. C. J. Adenoviruses as Vaccine Vectors. **Mol Ther**, v.10, n.4, p.616-629, 2004.

TOLIA, N. H.; ENEMARK, E. J.; SIM, B. K. L.; JOSHUA-TOR, L. Structural Basis for the EBA-175 Erythrocyte Invasion Pathway of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Cell**, v.122, n.2, p.183-193, 2005.

TRIGLIA, T.; HEALER, J.; CARUANA, S. R.; HODDER, A. N.; ANDERS, R. F.; CRABB, B. S.; COWMAN, A. F. Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. **Mol. Microbiol**, v.38, n.4, p.706-718, 2000.

TSUBOI, T.; KAPPE, S.; ALYAMAN, F.; PRICKETT, M.; ALPERS, M.; ADAMS, J. Natural variation within the principal adhesion domain of the *Plasmodium vivax* Duffy binding-protein. **Infect Immun**, v.62, p.5581 - 5586, 1994.

TSUBOI, T.; KASLOW, D. C.; GOZAR, M. M.; TACHIBANA, M.; CAO, Y. M.; TORII, M. Sequence polymorphism in two novel *Plasmodium vivax* ookinete surface proteins, Pvs25 and Pvs28, that are malaria transmission-blocking vaccine candidates. **J Mol Med**, v.4, n.12, p.772-782, 1998.

VANLOUBBEECK, Y.; PICHYANGKUL, S.; BAYAT, B.; YONGVANITCHIT, K.; BENNETT, J. W.; SATTABONGKOT, J.; SCHAECHER, K.; OCKENHOUSE, C. F.; COHEN, J.; YADAVA, A. Comparison of the immune responses induced by soluble and particulate *Plasmodium vivax* circumsporozoite vaccine candidates formulated in AS01 in rhesus macaques. **Vaccine**, v.31, n.52, p.6216-6224, 2013.

VICENTIN, E. C.; FRANÇOSO, K. S.; ROCHA, M. V.; IOURTOV, D.; DOS SANTOS, F. L.; KUBRUSLY, F. S.; SAKAUCHI, M. A.; RAW, I.; NOSTEN, F.; RÉNIA, L.; RODRIGUES, M. M.; RUSSELL, B.; SOARES, I. S. Invasion-Inhibitory Antibodies Elicited by Immunization with *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen-1 Expressed in *Pichia pastoris* Yeast. **Infect Immun**, v.82, n.3, p.1296-1307, 2014.

WEISS, W. R.; SEDEGAH, M.; BEAUDOIN, R. L.; MILLER, L. H.; GOOD, M. F. CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for

protection in mice immunized with malaria sporozoites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.85, n.2, p.573-576, 1988.

WERNSDORFER, W. H. **Malaria: Principles and Practice of Malariology** ed.: Churchill Livingstone. 1988

WERTHEIMER, S. P.; BARNWELL, J. W. Plasmodium vivax interaction with the human Duffy blood group glycoprotein: Identification of a parasite receptor-like protein. **Exp Parasitol**, v.69, n.3, p.340-350, 1989.

WHO, W. H. O. World Malaria Report 2014. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/ 2014.

WINSTONE, N.; GUIMARÃES-WALKER, A.; ROBERTS, J.; BROWN, D.; LOACH, V.; GOONETILLEKE, N.; HANKE, T.; MCMICHAEL, A. J. Increased detection of proliferating, polyfunctional, HIV-1-specific T cells in DNA-modified vaccinia virus Ankara-vaccinated human volunteers by cultured IFN- γ ELISPOT assay. **Eur. J. Immunol**, v.39, n.4, p.975-985, 2009.

WU, Y.; ELLIS, R. D.; SHAFFER, D.; FONTES, E.; MALKIN, E. M.; MAHANTY, S.; FAY, M. P.; NARUM, D.; RAUSCH, K.; MILES, A. P.; AEBIG, J.; ORCUTT, A.; MURATOVA, O.; SONG, G.; LAMBERT, L.; ZHU, D.; MIURA, K.; LONG, C.; SAUL, A.; MILLER, L. H.; DURBIN, A. P. Phase 1 Trial of Malaria Transmission Blocking Vaccine Candidates Pfs25 and Pvs25 Formulated with Montanide ISA 51. **PLoS ONE**, v.3, n.7, p.e2636, 2008.

XAINLI, J.; ADAMS, J.; KING, C. The erythrocyte binding motif of Plasmodium vivax duffy binding protein is highly polymorphic and functionally conserved in isolates from Papua New Guinea. **Mol Biochem Parasitol**, v.111, 2000.

ZAK, D. E.; ANDERSEN-NISSEN, E.; PETERSON, E. R.; SATO, A.; HAMILTON, M. K.; BORGERDING, J.; KRISHNAMURTY, A. T.; CHANG, J. T.; ADAMS, D. J.; HENSLEY, T. R.; SALTER, A. I.; MORGAN, C. A.; DUERR, A. C.; DE ROSA, S. C.; ADEREM, A.; MCEL RATH, M. J. Merck Ad5/HIV induces broad innate immune activation that predicts CD8+ T-cell responses but is attenuated by preexisting Ad5 immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.109, n.50, p.E3503–E3512, 2012.

ZAKERI, S.; BABAEKHO, L.; MEHRIZI, A. A.; ABBASI, M.; DJADID, N. D. Antibody Responses and Avidity of Naturally Acquired

Anti-Plasmodium vivax Duffy Binding Protein (PvDBP) Antibodies in Individuals from an Area with Unstable Malaria Transmission. **Am J Trop Med Hyg**, v.84, n.6, p.944-950, 2011.

ZEESHAN, M.; BORA, H.; SHARMA, Y. D. Presence of Memory T Cells and Naturally Acquired Antibodies in Plasmodium vivax Malaria-Exposed Individuals Against a Group of Tryptophan-Rich Antigens With Conserved Sequences. **Int J Infect Dis** v.207, n.1, p.175-185, 2013.

ZEESHAN, M.; TYAGI, K.; SHARMA, Y. D. CD4+ T Cell Response Correlates with Naturally Acquired Antibodies against Plasmodium vivax Tryptophan-Rich Antigens. **Infect Immun**, v.83, n.5, p.2018-2029, 2015.

ZEESHAN, M.; TYAGI, R. K.; TYAGI, K.; ALAM, M. S.; SHARMA, Y. D. Host-Parasite interaction: Selective pv-Fam-A family proteins of plasmodium vivax bind to a restricted number of human erythrocyte receptors. **Int J Infect Dis** v.211, n.7, p.1111-1120, 2015.

ZHANG, Y.; CHIRMULE, N.; GAO, G.-P.; QIAN, R.; CROYLE, M.; JOSHI, B.; TAZELAAR, J.; WILSON, J. M. Acute Cytokine Response to Systemic Adenoviral Vectors in Mice Is Mediated by Dendritic Cells and Macrophages. **Mol Ther**, v.3, n.5, p.697-707, 2001.

ZIMMERMAN, P. A.; FERREIRA, M. U.; HOWES, R. E.; MERCEREAU-PUIJALON, O. Chapter Two - Red Blood Cell Polymorphism and Susceptibility to Plasmodium vivax. In: S.I. HAY, R. P.; BAIRD, J. K. **Adv Parasitol**. ed.: Academic Press, 2013. v. Volume 81, p. 27-76.

CAPÍTULO II:
**Estudos com os principais antígenos da fase
eritrocítica em primatas não humanos**

1 APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

O presente capítulo apresenta os resultados de um ensaio pré-clínico realizado em primatas não humanos com alguns dos nossos candidatos vacinais, dentre eles as proteínas PvDBP-II-MT e PA. Esses dois antígenos foram escolhidos em virtude dos bons resultados descritos pela Dra. Marisa Cristina da Fonseca Casteluber durante seu doutorado, os quais empregamos para elaborar o manuscrito apresentado na minha qualificação.

Neste capítulo, são descritas a proteção e as respostas imunes estimuladas após imunização com a mistura de quatro antígenos do estágio eritrocítico do *P. vivax* (PvAMA1, PvMSP1₁₉, PvDBP-II-MT e PA), administrados com o protocolo heterólogo P/P/A.

Estes experimentos foram produto da parceria de nosso grupo de pesquisa com o Centro de Investigación Científica Cauceseco em Cali, Colômbia. Como produto desta pesquisa, foi escrito um manuscrito intitulado:

Immunogenicity and Protective Efficacy of recombinant P. vivax antigens administered in prime-boost protocols to Aotus monkeys, que em breve será submetido para publicação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

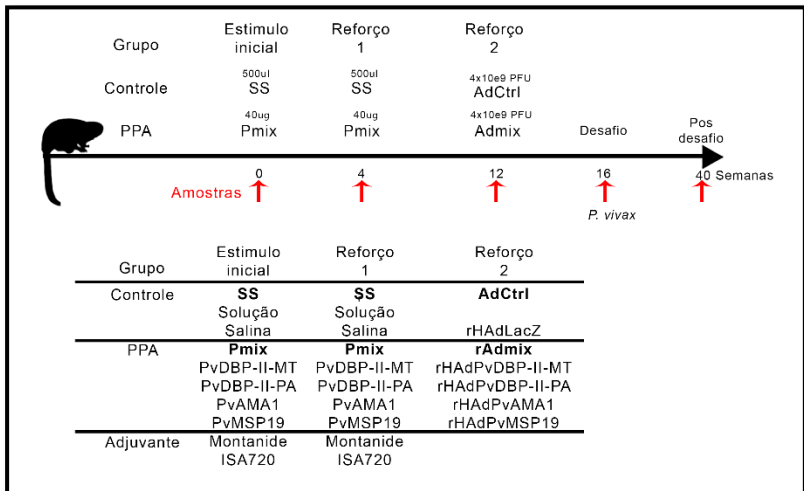
2.1 Protocolos de imunizações dos primatas não humanos

Para o presente estudo foram usados 14 macacos *Aotus lemurinus griseimembra*, machos e fêmeas não prenhas, provenientes da Fundación Centro de Primates (FUCEP) em Valle del Cauca, Colômbia. Tais animais foram imunizados, segundo os protocolos descritos na **Figura 14**, manipulados e desafiados nas instalações do Centro de Investigación Científica Cauceseco conforme os protocolos éticos da mesma FUCEP e da CEUA/UFMG.

Brevemente, 12 macacos pesando em média 800 g., com funções hepáticas e renais normais e bom estado geral de saúde foram previamente tratados com antiparasitários (Mebendazol durante 5 dias a 35 mg/Kg e Ivermectina por 24 h a 200 µg/Kg) e separados em dois grupos contendo 6 animais cada um (6 controles (Ctrl) e 6 animais imunizado com proteínas, proteínas e adenovírus (PPA)).

As coletas de sangue para os posteriores ensaios foram realizadas antes de cada imunização e do desafio, e 40 semanas após o início do experimento. As proteínas e adenovírus recombinantes utilizados foram construídos e analisados pelo nosso grupo e enviados até a Colômbia para sua utilização na presente pesquisa.

Figura 14. Protocolo de imunizações utilizado para avaliar a capacidade imunogênica dos candidatos vacinais baseados nas proteínas PvDBP-II-MT e PA, AMA1 e MSP1₉. Na parte superior pode ser observado o esquema vacinal utilizado no presente trabalho. Os primatas não humanos foram separados em dois grupos (controles e PPAmix). Os animais controle foram imunizados via subcutânea no dia zero (Estímulo Inicial), assim como quatro semanas depois (Reforço 1) com 500 μ L contendo solução salina (SS), e oito semanas após o Reforço 1 (Reforço 2) com 4 x 10⁹ PFU/animal de rAdCtrl. Os indivíduos do grupo PPAmix foram imunizados nos mesmos períodos de tempo com um estímulo inicial e um posterior reforço 1 contendo 40 μ g/animal de mistura de antígenos proteicos (P_{mix}) e com um reforço 2 contendo 4 x 10⁹ PFU/animal da mistura de adenovírus recombinantes (rAd_{mix}). Finalmente, ambos grupos foram desafiados por via intravenosa quatro semanas depois do Reforço 2 com 10⁵ formas sanguíneas de parasito vivo *P. vivax* (Salvador-I). As coletas de amostras foram realizadas antes de cada imunização e do desafio, assim como 24 semanas após do mesmo. Na parte inferior estão descritas as formulações empregadas tanto no Estímulo Inicial como nos Reforços para os grupos Controle e PPAmix.



2.2 Estudo das respostas imunes humorais estimuladas pelos candidatos vacinais

As respostas imunes humorais estimuladas pelos candidatos vacinais formulados com os principais antígenos PvDBP-II-MT, PvDBP-II-PA,

PvAMA1 (BOUILLET et al., 2011b) e PvMSP1₁₉-PADRE (CUNHA et al., 2001) foram analisadas pelo método de ELISA, assim como por imunofluorescência indireta (IFAT) a partir das amostras de sangue coletadas conforme aos protocolos próprios do Centro de Investigación Científica Caucaseco.

2.2.1 Detecção dos níveis de anticorpos específicos mediante ensaios de ELISA

Anticorpos IgG específicos contra os quatro antígenos maláricos presentes no soro coletado dos animais foram avaliados por ELISA em placas de 96 poços (Maxisorp; Nunc, Roskilde, Denmark). As placas foram sensibilizadas durante 2 h a 37 °C com 200 µg/poço das quatro proteínas, misturadas ou separadas, em Coating Buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6) + 2 % albumina do soro bovino (BSA). Após esse período, as placas foram bloqueadas com PBS + 2.5% BSA durante 16 h a 4 °C, lavadas com PBS-T e incubadas durante 1 h a 37 °C com diferentes diluições dos soros dos macacos imunizados + 1% BSA. Após incubação, as placas foram novamente lavadas com PBS + 0,05% Tween 20 e incubadas com o anticorpo secundário anti IgG de Aotus conjugado a peroxidase (produzido no centro de Desenvolvimento de drogas e vacinas contra Malária, Cali, Colômbia e conjugado no Absea Biotechnology Ltd., Beijing, People's Republic of China). Finalmente, as placas foram analisadas mediante determinação da absorvância de luz de frequência de 405 nm (OD₄₀₅) em espectrofotômetro (MRX; Dynex Technologies, Inc., Chantilly, VA). O ponto de corte foi determinado pela absorvância média obtida do soro de 10 macacos não imunizados e com ausência de histórico de malária frente aos diversos antígenos. Os foram considerados positivos quando maiores ou iguais ao ponto de corte acrescido de três desvios padrões (± 3 SD).

2.2.2 Avaliação do potencial reativo dos anticorpos induzidos mediante ensaios de imunofluorescência

O potencial reativo dos anticorpos IgG gerados nos primatas imunizados contra o *P. vivax*, cepa variante Salvador-I foi avaliado por IFAT seguindo protocolo descrito anteriormente por Golenda e colaboradores (1997) com certas modificações (GOLEND A et al., 1997).

Brevemente, amostras coletadas de sangue dos macacos infectados com *P. vivax*-Sal-I foram passadas por colunas CF11 celulose, para a remoção dos leucócitos presentes, centrifugadas a 5000 g por 10 minutos a temperatura ambiente (T amb) e analisadas por coloração de Giemsa para determinar os estágios parasitários presentes. Posteriormente, a fração

parasitária foi lavada três vezes com meio RPMI e cultivada por 40 h. Em seguida, os esquizontes obtidos foram fixados às lâminas e incubados por 1 h com os soros dos macacos imunizados diluídos 1:50 com PBS. Após essa hora, as amostras foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário anti-Aotus IgG conjugado a fluoresceína (produzido no Centro de Desenvolvimento de Drogas e Vacinas contra Malária, Cali, Colômbia e conjugado no Absea Biotechnology Ltd., Beijing, People's Republic of China), lavados e analisados no microscópio de fluorescência.

2.3 Triagem do perfil de citocinas estimulados pelos candidatos vacinais formulados com os principais antígenos da fase eritrocitária

As análises dos perfis de citocinas [Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α), Th2 (IL-4 e IL-5), Treg (IL-10)] e a produção de IFN- γ pelas células mononucleares do sangue periférico (PMBC) foram realizados no Centro Internacional de Vacinas em Cali, Colômbia com os kits comerciais *Non-Human Primate Th1/Th2 Cytometric Bead Array kit* (CBA; BD Bioscience) e *human IFN- γ ELISpot* (MABTECH, Stockholm, Sweden) conforme especificações dos fabricantes.

2.3.1 Detecção de citocinas presentes no soro mediante Arranjo citométrico por beads (CBA)

Para a detecção das citocinas presentes no soro dos macacos imunizados e controle foram realizados ensaios de citometria de fluxo com contas. Inicialmente os padrões de citocinas foram reconstituídos e diluídos de forma seriada em 200 μ L de diluente (abastecido pelo kit) antes de serem misturados com os contas de captura e reagentes de detecção (portadores dos anticorpos anti-human IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF e IFN- γ). Posteriormente, 50 μ L das diluições dos soros dos macacos foram incubados com 50 μ L de cada pool de contas por 3 h a T amb.

Após a incubação, as amostras foram lavadas com 1 ml de Wash Buffer e centrifugadas a 200 g por 5 minutos.

Posteriormente, os pellets foram ressuspensos com 300 μ L de Wash Buffer e incubados com o reagente de detecção (portador dos anticorpos anti-human IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF e IFN- γ) durante 3 h a T amb nas placas de leitura.

Após este tempo, as placas foram lavadas com Wash Buffer e analisadas por citometria de fluxo contra as curvas padrões geradas para cada padrão de citocina.

2.3.2 Detecção do IFN- γ secretado pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) por teste Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT)

Como primeiro passo nos ensaios de ELISPOT, placas de 96 poços com 5 $\mu\text{g/ml}$ do anticorpo de captura Anti-human IFN- γ mAb (1-D1K; Mabtech AB) foram incubadas por 16 h a 4 °C. Em seguida os poços foram lavados e bloqueados por 2 h com meio RPMI com 10% de soro humano a T amb. Após o bloqueio, foram adicionadas a cada poço 200 μL das soluções contendo 5×10^5 PBMC e 10 $\mu\text{g/ml}$ das proteínas de interesse purificadas, separadas ou em conjunto (MSP1₁₉, AMA1, PvDBP-II-MT e PvDBP-II-PA) e colocadas novamente em incubação por 40 h a 37 °C com 5% CO₂. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas duas vezes com PBS-T e incubadas com 1 $\mu\text{g/ml}$ do anticorpo de detecção biotinylated anti-IFN- γ mAb (7-B6-1; Mabtech AB) por 16 h a 4 °C.

Finalmente, as placas foram lavadas duas vezes com PBS-T e posteriormente com PBS e reveladas com a adição de estreptavidina conjugada a fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) em presença de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT) (Sigma-Aldrich) para detecção colorimétrica.

A contagem dos spots foi determinada em lupa binocular e os resultados foram expressos em números de spots por 10^6 PBMC.

2.4 Estudo *in vivo* da capacidade protetora do candidato vacinal baseado nos principais antígenos da fase eritrocítica da junção PvDBP-DARC

O estudo da capacidade protetora *in vivo* dos candidatos vacinais foi realizado no Centro Internacional de Vacunas em Cali, Colômbia.

Brevemente, 10^5 formas sanguíneas do *P. vivax*-Sal-I, gentilmente doados pelo Dr. William Collins (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA), foram multiplicados em dois macacos *Aotus lemurinus griseimembra* sem imunizar com o candidato vacinal. Estes parasitos foram posteriormente retirados e utilizados para o desafio dos dois grupos de macacos experimentais. A parasitemia foi semanalmente avaliada por coloração de Giemsa até o dia 56 ou até os animais apresentarem sintomas da doença. Finalmente, todos os animais foram tratados com 25 mg de Sulfadoxina + Pirimetamina.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de primatas não humano no presente estudo foi aprovado pelas instituições participantes baseado na alta homologia genética entre tal espécie com a humana e a incapacidade do *P. vivax* de infectar outras espécies além das primatas (AMERI, 2010; CULLETON; FERREIRA, 2012). Outra dificuldade no desenvolvimento de novos candidatos vacinais contra esta espécie, é a falta de protocolos de cultura de longa duração (ROOBSONG et al., 2015) que permita a obtenção de *Anopheles* infectados e a consequência, o mantimento deste parasito no laboratório.

No presente trabalho os títulos de ELISA, IFAT, CBA e ELISPOT estimulados pelo candidato vacinal são apresentados qualitativamente na **Tabela 3**, assim como os valores da parasitemia total atingidos após o desafio com o parasito.

Tabela 3. Resumo qualitativo dos principais títulos obtidos nos ensaios ELISA, IFAT, CBA, ELISPOT (IFN- γ) e parasitemia acumulada ao final do desafio.

Animal	Tratamento	ELISA					ELISPOT					CBA	IFAT	PARASITEMIA
		MIX	AMA1	MSP1 ₂₉	DBP-PA	DBP-MT	MIX	AMA	MSP	DBPPA	DBPMT	IL2	IFAT	
797	Pmix	8000	8000	6000	5000	5000	17,5	15	12,5	5	2,5	3,98	400	
105		6000	20000	4000	2000	4000	5	2,5	2,5	0	0	4,11	6400	
785		16000	20000	10000	5000	5000	17,5	10	7,5	10	10	4,11	6400	
774		16000	6000	10000	2000	4000	22,5	20	12,5	2,5	2,5	6,09	6400	
15		16000	20000	10000	2000	5000	12,5	17,5	10	2,5	0	3,85	6400	
797	PPmix	16000	32000	8000	6000	5000	20	12,5	10	2,5	5	4,64	800	
105		4000	8000	2000	4000	1000	15	10	7,5	2,5	2,5	4,24	6400	
785		16000	16000	10000	10000	8000	20	12,5	10	12,5	10	4,37	6400	
774		32000	32000	16000	8000	5000	32,5	25	20	2,5	5	4,77	3200	
15		20000	20000	16000	16000	16000	12,5	17,5	7,5	2,5	0	4,24	6400	
797	PPAmix	16000	16000	8000	4000	2000	22,5	17,5	15	7,5	5	4,37	12800	
105		4000	16000	2000	2000	1000	20	17,5	12,5	7,5	5	4,05	6400	
785		8000	16000	16000	10000	16000	20	15	7,5	12,5	10	3,92	3200	
774		30000	32000	18000	8000	4000	35	22,5	22,5	2,5	2,5	4,64	6400	
15		16000	32000	8000	8000	8000	15	20	12,5	2,5	5	4,64	12800	
797	DESAFIO	160000	80000	40000	40000	60000	12,5	10	10	2,5	0	4,64	35000	9440
105		80000	60000	60000	20000	40000	12,5	10	5	2,5	0	4,24	30000	15640
785		40000	60000	40000	20000	40000	15	5	7,5	5	5	3,98	35000	3350
774		60000	80000	40000	20000	20000	20	17,5	15	0	0	3,98	35000	20920
15		80000	80000	40000	40000	40000	10	12,5	7,5	0	2,5	4,64	35000	16990

Muito baixo (Vermelho) Baixo (Laranja) Médio(Amarelo) Alto (Verde claro) Muito alto (Verde).

3.1 Avaliação dos níveis de resposta imune humoral estimulada após a imunização com os principais antígenos da fase eritrocitária

3.1.1 Quantificação por ELISA dos títulos de anticorpos IgG induzidos pelas diversas imunizações

A capacidade imunogênica das quatro proteínas recombinantes (Pmix), administradas como estímulo inicial e posteriormente como reforço imune, assim como dos quatro adenovírus recombinantes (rAdmix), administrado como segundo reforço (Figura 14) foram avaliadas separadas ou conjuntamente. Para isso, amostras dos soros dos *Aotus* imunizados foram coletados antes de cada dose vacinal, assim como antes e após 28 semanas do desafio, e os títulos dos anticorpos específicos gerados em cada primata foram quantificados pelo ensaio de ELISA como mostrados na **Figura 15**.

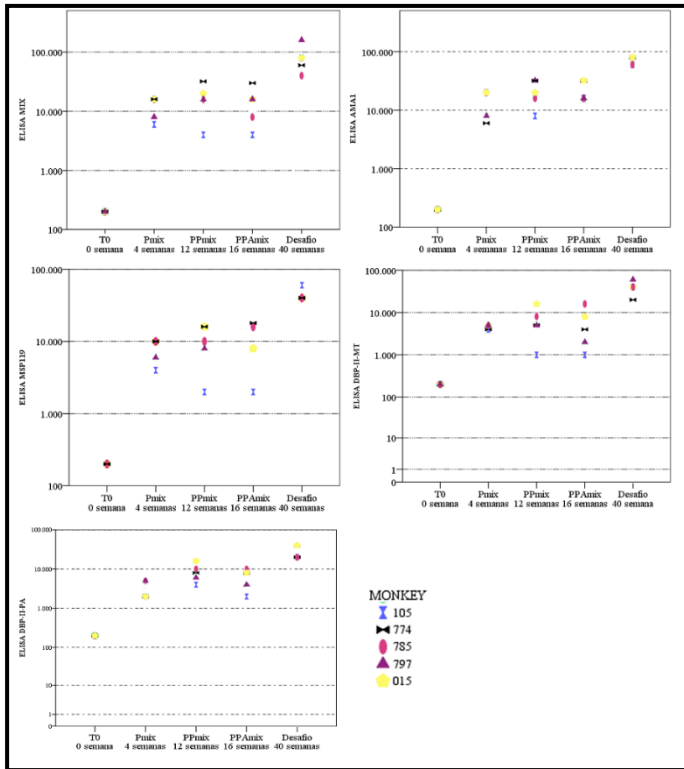
Analisando a imunogenicidade dos quatro antígenos em cada indivíduo imunizado, pode-se concluir que apesar de existir resposta imune específica em todos os indivíduos vacinados, a imunização foi heterogênea, existindo altos e baixos respondedores à vacina.

Desta forma, após quatro semanas da administração do Pmix, o indivíduo 785 produziu anticorpos acima da média contra os quatro antígenos, seguido pelo 015. Como pode ser observado na tabela 2.

Já após o primeiro reforço, PPMix, observou-se um aumento nas sínteses de anticorpos nos indivíduos 774 e 797, que da mesma forma que o indivíduo 015, apresentaram valores acima da nova média contra ao menos um dos antígenos.

O reforço prévio ao desafio, rAdmix, não conseguiu aumentar os títulos dos anticorpos contra os quatro antígenos, mantendo-se os valores por acima da média nos indivíduos 774, 015, 785 e os menores nos 797 e 105.

Figura 15. Título de anticorpos induzidos em cada indivíduo após administração dos candidatos vacinais através do tempo. ELISA realizado em placas sensibilizadas com as proteínas (PvDBP-II-MT, PvDBP-II-PA, PvAMA1 e PvMSP1₁₉) separadas ou misturadas (MIX) como indicado em cada caso. Como anticorpos primários foram utilizados os soros dos primatas imunizados diluídos de forma seriada de 1:200 até 1:160000. O anticorpo secundário anti-IgG de Aotus foi utilizado na diluição 1:10000. Ponto de corte valor média +/- três desvios padrão.



Na **Figura 16**, mostram-se as médias dos títulos de anticorpos contra cada antígeno individual (AMA1, MSP1₁₉, DBP-II-PA e DBP-II-MT), assim como contra a mistura de todos eles quando aderidos no fundo da placa de 96 poços.

Nesta cinética, no tempo zero, os animais apresentaram títulos basais de 200 para todos os anticorpos. Estes títulos aumentaram, quatro semanas após a administração do Pmix e foram significativamente diferentes aos

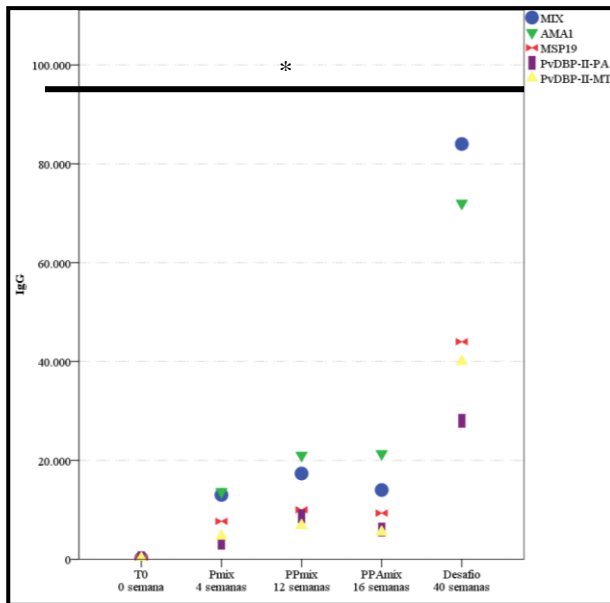
valores basais como mostrado na **Tabela 4**. Ainda em esta tabela pode se observar que a administração da segunda dose de proteínas, Ppmix, induziu um aumento significativo dos títulos de anticorpos em todos os casos.

Tabela 4.-Título de anticorpos induzido após administração da formulação vacinal com os 4 antígenos AMA1, MSP1₁₉, DBP-II-PA e DBP-II-MT.

Imunização	IgG específica				
	Média ± Desvio padrão				
	MIX	AMA1	MSP1 ₁₉	DBP-II-MT	DBP-II-PA
T0 (0 semanas)	200 ± 6,3	200 ± 4,7	200 ± 6,3	200 ± 6,3	200 ± 6,3
Pmix (4 semanas)	12400 ± 49,8	14800 ± 54,4	8000 ± 40	4600 ± 30,3	3200 ± 25,3
PPmix (12 semanas)	17600 ± 59,33	21600 ± 65,7	10400 ± 45,6	7000 ± 37,4	8800 ± 41,9
PPAmix (16 semanas)	14800 ± 54,4	22400 ± 66,9	10400 ± 45,6	6200 ± 35,2	6400 ± 35,8
Desafio (40 semanas)	84000 ± 129,6	72000 ± 120	44000 ± 93,8	40000 ± 89,4	28000 ± 74,8
Ctrl (-) (40 semanas)	1250 ± 17,6	250 ± 7,9	1125 ± 16,7	--	--

Na Figura 16, também pode ser observado que os níveis dos anticorpos induzidos pelo estímulo da terceira dose, o adenovírus (PPAmix), não aumentaram, podendo isto indicar uma baixa imunogenicidade dos diversos rHAD utilizados. Contudo, os títulos chegaram a seus pontos mais altos após do desafio.

Figura 16. Valor médio dos títulos de anticorpos induzidos nos seis primatas *Aotus* imunizados. ELISA em placas sensibilizadas com as proteínas (PvDBP-II-MT, PvDBP-II-PA, PvAMA1 e PvMSP1₁₉) separadas assim como misturadas (MIX). Como anticorpos primários foram utilizados os soros dos primatas imunizados diluídos em diluição seriada de 1:200 até 1:160000. O anticorpo secundário anti-*Aotus* IgG foi utilizado na diluição 1:10000. Os dados foram analisados por GLM no IBM SPSS Statistics 23 e comparados pelo t-student, $p < 0,05$, corrigido pelo coeficiente de Sidak.



A diferença significativa entre a produção dos anticorpos pelos animais imunizados e os controles observada desde a primeira imunização até o desafio, permite concluir que os antígenos empregados estimularam a produção de altos níveis de anticorpos IgG específicos.

A análise dos resultados obtidos por intermédio do modelado linear geral (GLM) indicaram que a quantidade de anticorpos sintetizada em cada um dos tempos tem uma relação direta com o número de imunizações e com o tempo transcorrido. Assim mesmo, mediante deste modelo, foram determinadas as diferenças estatísticas entre as diferentes imunizações pelo teste t-student, com valores de $p < 0,05$ corrigido pelo coeficiente SIDAK, para diminuir os erros Tipo I (Afirmar que não existe diferença

significativa quando existe) em várias hipóteses simultâneas (LEGENBRE; LEGENBRE, 2012).

As superioridades dos títulos obtidos após as imunizações com respeito ao tempo zero indicam que os antígenos utilizados são imunogênicos. Neste contexto, os valores das pendentes obtidas para cada um dos anticorpos com respeito ao tempo permite afirmar que ao parecer os antígenos AMA1, MSP1₁₉, seguidos pelos DBP-II-MT e finalmente DBP-II-PA, foram os mais imunogênicos. Recentemente, Obaldia et al (2017) observaram efeitos humorais parecidos em soros de primatas *Aotus*, após ser imunizados com os antígenos AMA1 e MSP1₄₁ administrados em 3 priming com DNA e um boost com os rHAD.

Assim mesmo, a baixa imunogenicidade das proteínas PvDBP formuladas com o adjuvante Montanide ISA 720 observada no presente trabalho, é congruente com estudos prévios, nos quais foram descritos uma melhor produção destes anticorpos quando formulados com o adjuvante de Freund (ARÉVALO-HERRERA et al., 2005).

A diferença entre os títulos atingidos após as diferentes estimulações assim como os resultados estatísticos são apresentados na **Tabela 5**. Nesta tabela se observa na cor vermelha, que as imunizações PPAmix enfraqueceram todos os títulos dos anticorpos em comparação com a imunização PPMix, menos o correspondente a AMA1. Da mesma maneira ressalta que os níveis de anticorpos estimulados após qualquer imunização são maiores que os estimulados nos controles negativos após o desafio (Ctrl (-) desafio).

Tabela 5. Diferenças dos títulos de anticorpos induzidos após administração do protocolo PPAmix.

Imunizações		IgG				
		MIX	AMA1	MSP1 ₁₉	DBP-II-MT	DBP-II-PA
(I)	(J)	Diferença (I-J)				
T0 (0 semanas)	Pmix (4 semanas)	-12200 *	-14600 *	-7800 *	-4400 *	-3000 *
	PPmix (12 semanas)	-17400 *	-21400 *	-10200 *	-6800 *	-8600 *
	PPAmix (16 semanas)	-14600 *	-22200 *	-10200 *	-6000 *	-6200 *
	Desafio (40 semanas)	-83800 *	-71800 *	-43800 *	-39800 *	-27800 *
	Ctrl (-) (40 semanas)	-1050 *	-50 *	-925 *	--	--

Pmix (4 semanas)	PPmix (12 semanas)	-5200 *	-6800 *	-2400 *	-2400 *	-5600 *
	PPAmix (16 semanas)	-2400 *	-7600 *	-2400 *	-1600 *	-3200 *
	Desafio (40 semanas)	-71600 *	-57200 *	-36000 *	-35400 *	-24800 *
	Ctrl (-) (40 semanas)	11150 *	14550 *	6875 *	--	--
PPmix (12 semanas)	PPAmix (16 semanas)	2800 *	-800 *	0 *	800 *	2400 *
	Desafio (40 semanas)	-66400 *	-50400 *	-33600 *	-33000 *	-19200 *
	Ctrl (-) (40 semanas)	16350 *	21350 *	9275 *	--	--
PPAmix (16 semanas)	Desafio (40 semanas)	-69200 *	-49600 *	-33600 *	-33800 *	-21600 *
	Ctrl (-) (40 semanas)	13550 *	22150 *	9275 *	--	--
Desafio (40 semanas)	Ctrl (-) (40 semanas)	82750 *	71750 *	42875 *	--	--

* Diferenças significativas entre os tratamentos apresentados na coluna **I** vs **J**. (ex. O Título de anticorpos no T0- Coluna **I**) é inferior em 12800 unidades ao título Pmix – Coluna **J**).

Comparação múltipla pelo t-student, $p < 0,05$.

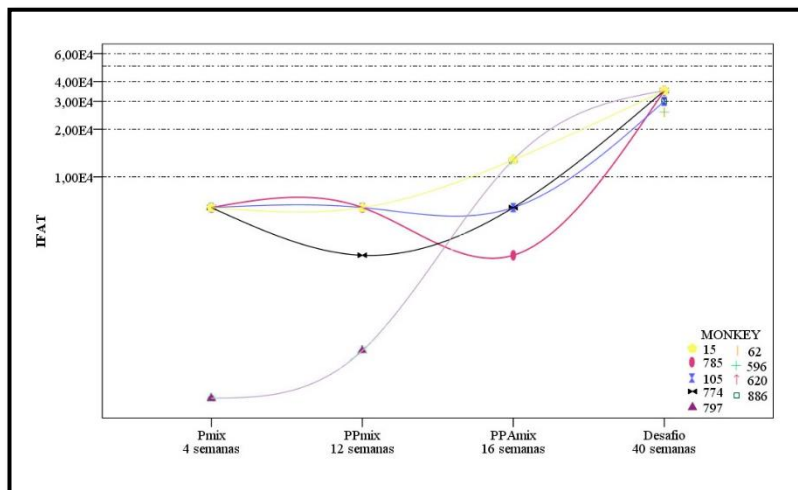
Valores em vermelho indicam que os títulos de anticorpos da coluna **I** são maiores aos apresentados na coluna **J**.

Finalmente, é interessante observar que no ELISA sensibilizado com as quatro proteínas, não teve um título igual à somatória dos antígenos que o compõe, indicando uma possível interferência entre estes no momento da avaliação.

3.1.2 Análises da capacidade de reconhecimento dos anticorpos sintetizados por IFAT

Após ter verificado as sínteses dos anticorpos IgG específicos contra as quatro proteínas utilizadas, se procedeu avaliar a capacidade destes em reconhecer parasitos por IFAT. A **Figura 17** apresenta o reconhecimento dos esquizontes pelos anticorpos específicos presentes em cada soro dos primatas imunizados.

Figura 17. Títulos de anticorpos detectados por imunofluorescência observados em cada primata não humano após cada imunização com o protocolo PPAmix. Reconhecimento dos esquizontes fixados em lâminas pelos soros diluídos em PBS. Como anticorpos primários foram utilizados os soros dos primatas imunizados diluídos de forma seriada de 1:200 até 1:160000. O anticorpo secundário anti-Aotus IgG foi utilizado na diluição 1:10000.



Nesta Figura 17, podemos observar que os títulos de fluorescência induzidos pela administração da primeira dose, Pmix, não foram iguais nos seis indivíduos imunizados, apresentando-se inferior no macaco 797 e elevados nos indivíduos 785, 105, 15 e 774, tal comparação pode ser observada de forma qualitativa na Tabela 2. Porém, esta vantagem se viu diminuída depois da administração da segunda dose, PPAmix, já que os níveis de anticorpos no indivíduo 797 aumentou, enquanto os outros quatro indivíduos permaneceram quase iguais ou até diminuíram, como no caso do 774.

A aplicação da terceira dose, rAdmix, estimulou um maior reconhecimento dos parasitos no macaco 797. Isto chama a atenção considerando que os anticorpos estimulados pelo segundo reforço neste indivíduo foi só um pouco inferior à média calculada.

Já as capacidades de reconhecimento estimuladas pelo desafio, não tiveram diferença estatística entre os indivíduos imunizados ($34000 \pm 1318,9$) e os controles negativos ($29050 \pm 1474,6$). Como pode ser

observado na cor vermelha na **Tabela 6**, a diferença entre estas duas médias foi 4950.

Tabela 6. Diferenças com respeito ao tempo das médias da capacidade de reconhecimento dos anticorpos estimulados, corrigidos pelos coeficientes de Sidak para a comparação múltipla, $p < 0,05$. As coletas e as análises das amostras de sangue foram realizadas antes da próxima imunização e 24 semanas após do desafio.

Imunização		Diferenças entre imunizações (I-J)			
(I)	Média Desv. padrão	PPmix (J)	PPAmix (J)	Desafio (J)	Desafio Ctrl (-) (J)
Pmix (4 semanas)	5200 ± 1318,9	560	-3120	-2880 *	-23850 *
PPmix (12 semanas)	4640 ± 1318,9	--	-3680	-29360 *	-2441 *
PPAmix (16 semanas)	8320 ± 1318,9	--	--	-25680 *	-20730 *
Desafio (40 semanas)	34000 ± 1318,9	--	--	--	4950
Ctrl (-) (40 semanas)	29050 ± 1474,6	--	--	--	--

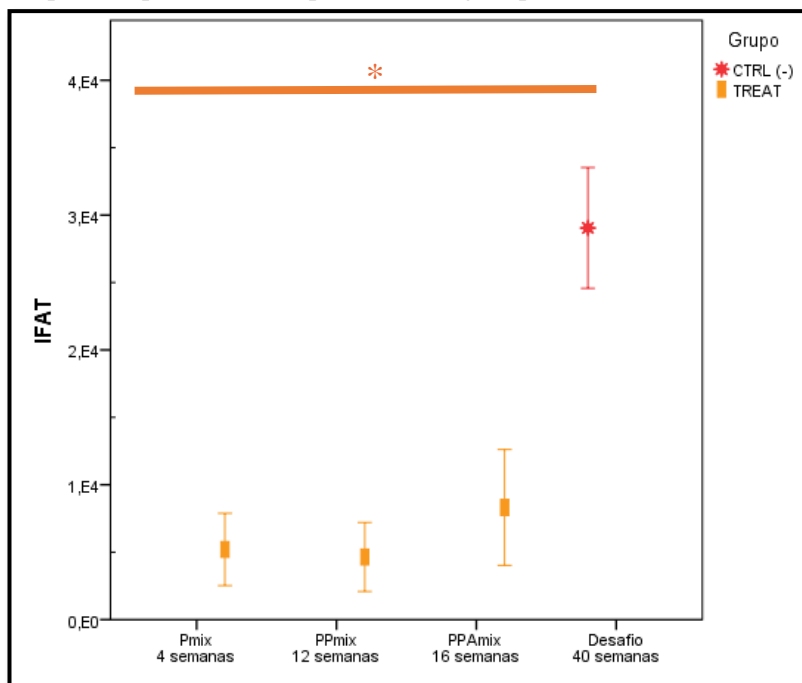
* Diferenças significativas das imunizações da coluna **I vs J**. Comparação múltipla pelo t-student, $p < 0,05$.

Valores em vermelho indicam que o reconhecimento dos anticorpos das imunizações da coluna I são maiores as imunizações na fila J.

A partir destes dados, poderíamos concluir que os anticorpos sintetizados pelos dois grupos atingiram a capacidade máxima de reconhecimento dos parasitos.

Na média grupal este aumento da capacidade de reconhecer os esquizontes eritrocitários do *P. vivax*, experimentou de forma geral um aumento exponencial no transcurso das 40 semanas avaliadas, como pode ser observado na **Figura 18 e na Tabela 6**.

Figura 18. Cinética da capacidade dos anticorpos de reconhecer esquizontes eritrocitários. Os valores representam os títulos de imunofluorescência (IFAT) dos animais imunizados. Reconhecimento dos esquizontes fixados em lâminas pelos soros diluídos 1:50 até 1:80000 em PBS e revelados com o anticorpo secundário anti-Aotus IgG conjugado a fluoresceína. A visualização foi realizada por microscópio de fluorescência a partir das amostras obtidas antes de cada imunização. Os dados foram analisados por GLM no IBM SPSS Statistics 23 e comparados pelo t-student, $p < 0,05$, corrigido pelo coeficiente de Sidak.



Na Figura 18 pode ser observado como o primeiro reforço, PPmix, provocou uma diminuição não significativa do reconhecimento em comparação com o alcançado pelo Pmix. Esta diferença de 560 unidades é descrita quantitativamente na Tabela 5, na cor vermelha. Assim mesmo, pode se observar que não existiu uma diferença significativa entre Pmix e PPAmix. A partir destes dados pode se concluir que provavelmente o método de transporte do Brasil até a Colômbia não foi o mais adequado, o que provocou uma diminuição da viabilidade e imunogenicidade dos adenovírus recombinantes.

Na tabela 6, pode se observar que a imunização com o rAdmix (8320), aumentou a capacidade de reconhecimento dos IgG gerados quando comparados com o primeiro (5200) e segundo reforço proteico (4640), Ppmix. Esses dados demonstraram a importância do segundo reforço adenoviral na formulação vacinal e a possibilidade de ter sido subestimado seus títulos de anticorpos durante o ensaio de ELISA.

Apesar disso, os maiores valores de reconhecimento, tanto no grupo imunizado como no controle negativo, se deram após o desafio.

O desafio com os parasitos, nestes dois grupos, estimulou significativamente seus reconhecimentos. Uma possível explicação para este fenômeno poderia ser que a presença dos componentes parasitários de forma integral é mais reativa que as frações utilizadas no presente trabalho.

Outro possível motivo poderia ser que a capacidade de reconhecimento estimulada pela primeira dose, Pmix, seja a maior possível artificialmente. Esta última explicação poderia ser reforçada pela sucinta diferença não significativa de 4950, descrita na tabela 5 na cor vermelha, observada entre os dois grupos após o desafio.

Finalmente, as análises de IFAT tanto individuais como grupais descritas na Figura 17 e 18 assim como na Tabela 6, demonstraram que existe relação direta entre o número de imunizações e a capacidade de reconhecimento do parasito. Entretanto, os títulos IFAT estimulados pelas diversas imunizações foram diferentes nos diversos primatas, sendo os mais baixos os sintetizados pelo indivíduo 797 após as imunizações Pmix e Ppmix.

Uma possível explicação para essa diferença, seria que o primata 797 apresentou o menor título de anticorpos contra as proteínas AMA1 e MSP1₁₉, após as imunizações com Pmix e Ppmix, porém a partir dos dados obtidos não é possível confirmar uma relação direta entre os títulos de anticorpos observados e a capacidade de reconhecimento dos esquizontes. .

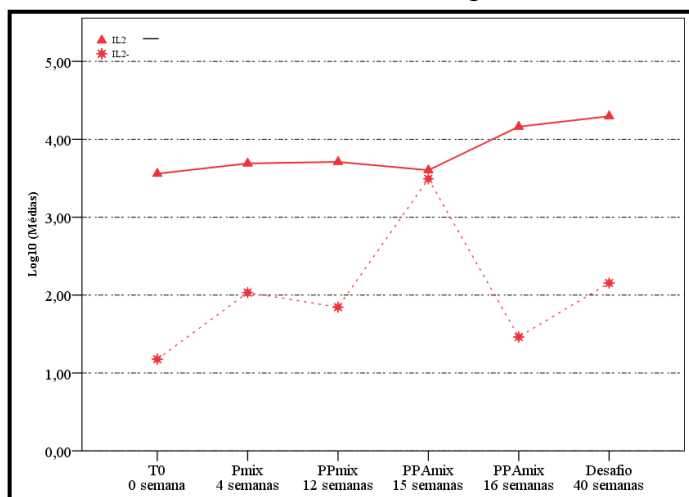
3.2 Triagem do perfil de citocinas estimulados pelos candidatos vacinais formulados com os principais antígenos da fase eritrocitária

3.2.1 Quantificação das citocinas estimuladas após as diversas imunizações e desafio mediante CBA

Para verificar se o processo de imunização dos macacos com os quatro antígenos induziu algum perfil de citocinas prioritário, os soros destes foram coletados antes da administração de cada dose e analisados por

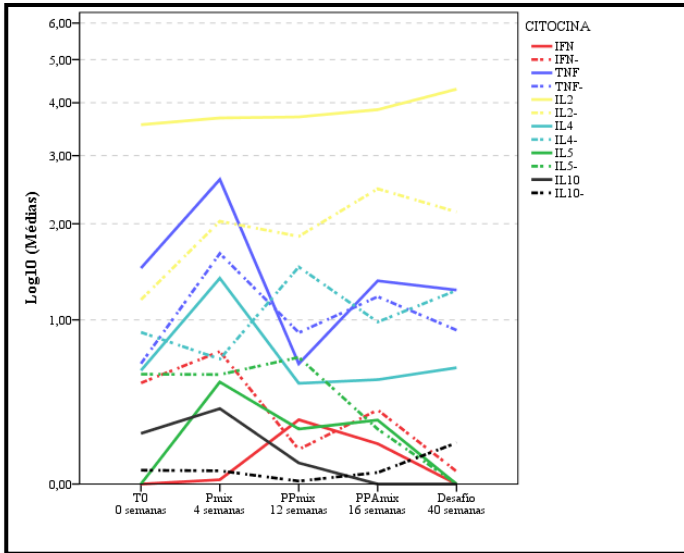
citometria de fluxo usando CBA segundo especificações do fabricante. Na **Figura 19** podem se observar os títulos da citocina IL-2 ao final do experimento assim como após cada imunização.

Figura 19. Análise da citocina IL-2 presente nos soros dos primatas imunizados e controle. Os macacos imunizados pelos diferentes protocolos foram avaliados quanto à produção de citocinas mediante citometria pelo *kit comercial Non-Human Primate Th1/Th2 Cytometric Bead Array kit* (CBA; BD Bioscience) e quantificados por citometria de fluxo. Os dados foram analisados por GLM no IBM SPSS Statistics 23 e comparados pelo t-student, $p < 0,05$, corrigido pelo coeficiente de Sidak. As linhas contínuas representam os \log_{10} dos títulos nos animais imunizados e as descontínuas aos controles negativos.



Os resultados obtidos a partir das análises das citocinas produzidas [Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α), Th2 (IL-4 e IL-5), Treg (IL-10)] não demonstraram nenhuma diferença significativa para nenhuma citocina entre cada imunização e nem entre os grupos, como pode ser observado na Figura 20, porém os títulos da IL-2 aumentaram com respeito ao tempo.

Figura 20. Análise das citocinas [Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α), Th2 (IL-4 e IL-5), Treg (IL-10)] presentes nos soros dos primatas imunizados e controle. Os macacos imunizados pelos diferentes protocolos foram avaliados quanto à produção de citocinas mediante citometria pelo *kit comercial Non-Human Primate Th1/Th2 Cytometric Bead Array kit* (CBA; BD Bioscience) e quantificados por citometria de fluxo. As linhas contínuas representam os \log_{10} dos títulos nos animais imunizados e as descontínuas aos controles negativos



Como pode ser observado na figura 20, a falta de um respaldo estatístico entre os títulos de citocinas estimulados pelos animais controle e imunizados poderia ser consequência da variabilidade genética apresentada entre os animais heterogênicos utilizados ou a casos sub clínicos não observados.

Porém, nenhum dos títulos das citocinas avaliadas, tiveram relação com os números de imunizações nem com o tempo nos quais foram feitos. Portanto pode se deduzir que os experimentos por citometria não foram suficientemente sensíveis ou os mais adequados para detectar as diferenças.

Baseado neste resultado, e considerando os títulos de anticorpos estimulados, pode se concluir que as análises das citocinas não foram suficientemente sensíveis para comprovar diferenças após cada imunização.

3.2.2 Quantificação do IFN- γ secretado pelas PBMC por intermédio de ELISPOT

Os resultados obtidos pelo ELISPOT mostraram que não existiu uma diferença entre as médias dos IFN- γ sintetizados pelas PBMC nos primatas imunizados e nos controles como pode se observar na **Figura 21**.

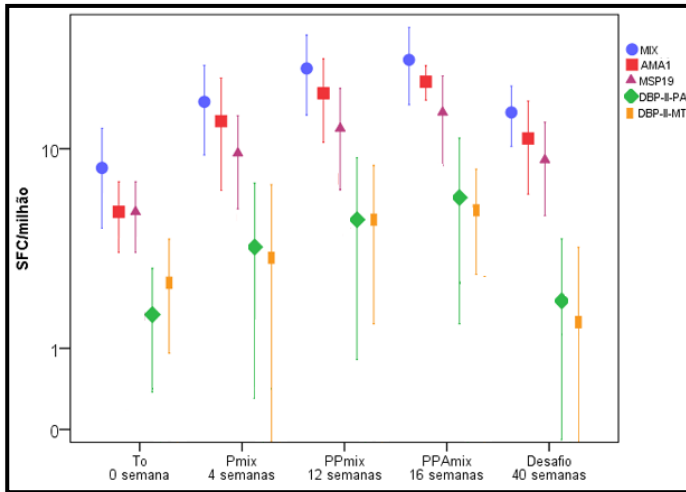
Os resultados mostraram que as quatro proteínas separadamente e em conjunto foram capazes de induzir a secreção de IFN- γ *in vitro* após cada imunização, decaindo drasticamente após 24 semanas a partir do desafio como pode ser observado na **Tabela 7**.

Esta relação entre o título dos IFN- γ e o número de imunização foi confirmada por GLM com um $p < 0.05$.

Tabela 7. Médias dos spots formados pelo IFN- γ secretado pelas PBMC em presença dos quatro antígenos isolados ou como mistura.

	MIX		AMA1		MSP1 ₁₉
	Ctrl (-)	Imuniz.	Ctrl (-)	Imuniz.	Ctrl (-)
T0 (0 semanas)	4,2 ± 1,8	8,33 ± 1,8	2,08 ± 1,4	5,42 ± 1,4	2,1 ± 1,2
Pmix (4 semanas)	6,7 ± 1,8	15,42 ± 1,8	5,0 ± 1,4	12,92 ± 1,4	3,3 ± 1,3
PPmix (12 semanas)	9,38 ± 2,2	20,83 ± 1,8	7,5 ± 1,7	16,67 ± 1,4	4,4 ± 1,5
PPAmix (16 semanas)	10 ± 2,2	22,5 ± 2	8,13 ± 1,7	18,5 ± 1,6	5,6 ± 1,5
Desafio (40 semanas)	6,3 ± 2,2	14 ± 2	5,0 ± 1,7	11,0 ± 1,6	3,13 ± 1,5
	MSP1₁₉	DBP-II-PA		DBP-II-MT	
	Imuniz.	Ctrl (-)	Imuniz.	Ctrl (-)	Imuniz.
T0 (0 semanas)	5,4 ± 1,2	0,42 ± 0,9	1,67 ± 0,9	0,42 ± 0,8	2,5 ± 0,8
Pmix (4 semanas)	9,6 ± 1,3	0,42 ± 0,9	3,8 ± 0,9	0,83 ± 0,84	3,33 ± 0,8
PPmix (12 semanas)	12,1 ± 1,3	0,63 ± 1,1	5,0 ± 0,9	0,63 ± 1,0	5,0 ± 0,8
PPAmix (16 semanas)	14,0 ± 1,4	1,3 ± 1,1	6,5 ± 1,0	1,25 ± 1,0	5,5 ± 0,9
Desafio (40 semanas)	9,0 ± 1,4	1,3 ± 1,1	2,0 ± 1,0	0,0 ± 1,0	1,5 ± 0,9

Figura 21. Análises por ELISPOT das médias de spots de IFN- γ secretado pelas PBMC presentes nos primatas imunizados e controle. A secreção do IFN- γ pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos macacos imunizados foi avaliada pelo *kit comercial human IFN- γ ELISPOT* (MABTECH, Stockholm, Sweden). Os spots formados foram revelados e quantificados em lupa binocular e os resultados foram analisados por GLM no IBM SPSS Statistics 23 e comparados pelo t-student, $p < 0,05$, corrigido pelo coeficiente de Sidak.



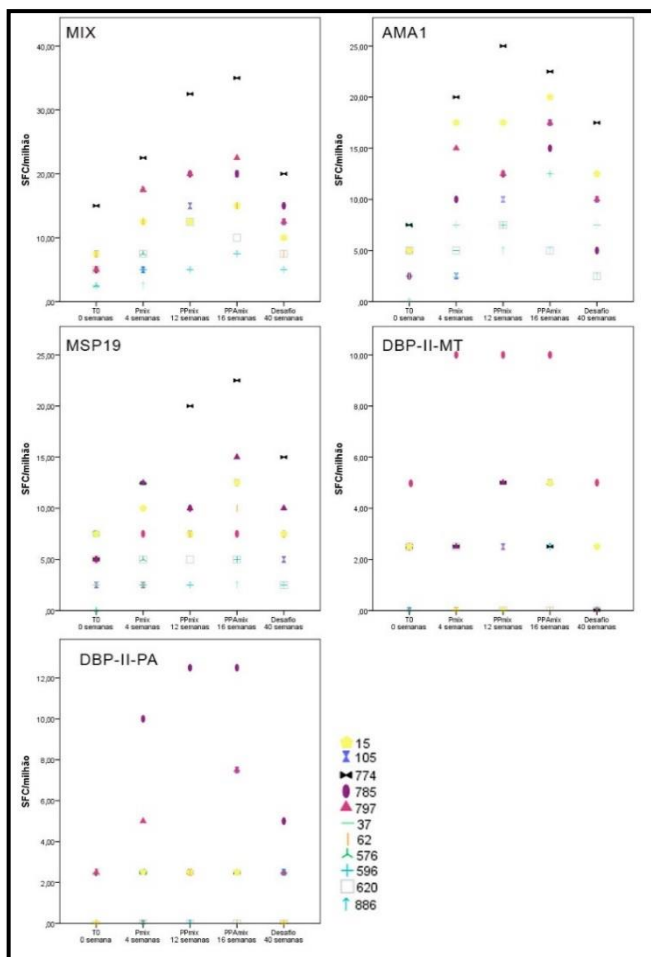
Porém, apesar das diferenças observadas no número de spots não levar a significância estatística estes valores aumentaram após cada imunização. Este aumento, tanto no grupo controle como no imunizado indicaria o potencial imunogênico tanto do adjuvante Montanide ISA720 quanto dos adenovírus recombinantes e os antígenos utilizados.

Baseado nestes resultados e nos títulos das IL-2 estimulados, poderia se concluir que os candidatos vacinais foram imunogênicos, porém devido aos experimentos terem sido realizados em animais com background genético misturado (outbreak) não se pode obter confiabilidade estatística suficiente para dar suporte matemático a esta observação. Análises individuais da secreção do IFN- γ são apresentados na **Figura 22**.

A secreção do IFN- γ pelas PBMC estimulada pelos candidatos vacinais foi heterogêneo. Contudo, interessantemente, da mesma forma ao caso dos anticorpos após a administração do rAdmix, os indivíduos 774, e 785,

mostraram níveis um pouco acima da média. Já no caso do indivíduo 015, este animal não mostrou a mesma eficiência, sendo superado pelo 797.

Figura 22. Análise individual dos spots formados pelo IFN- γ secretado pelas PBMC presentes nos primatas imunizados e controle. A secreção do IFN- γ pelas PBMC dos macacos imunizados foi avaliada pelo kit comercial human IFN- γ ELISPOT (MABTECH, Stockholm, Sweden). Os spots formados foram revelados pela adição de estreptavidina com fosfatase alcalina em presença do BCIP/NBT e quantificados em lupa binocular.



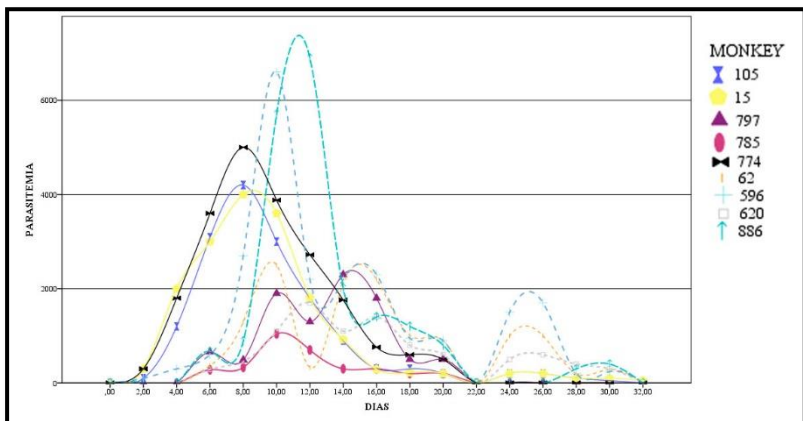
3.3 Proteção induzida por imunização com a vacina experimental formulada com os quatro antígenos da fase eritrocitária administrados pelo sistema dose-reforço heterólogo

Após quatro semanas da última imunização todos os membros dos dois grupos foram desafiados com o parasito *P. vivax* Salvador-I.

A parasitemia dos animais foi monitorada a cada dois dias mediante esfregaços sanguíneos e coloração de Giemsa, se observando diferentes graus de proteção entre os indivíduos dos grupos imunizados e controles. Os indivíduos 785 e 797 do grupo dos imunizados, apresentaram as menores parasitemias em comparação com todos os outros indivíduos do grupo PPAmix, como pode ser observado na Tabela 2, e em especial, com os 886 (40520) e 596 (44980) pertencentes ao grupo controle.

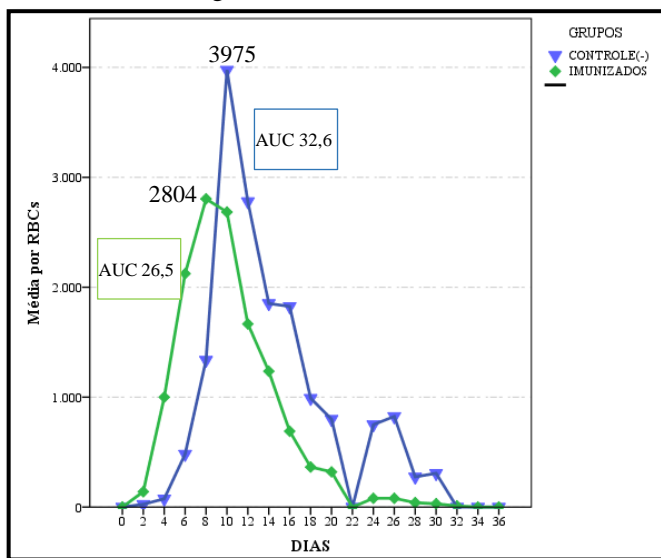
Os animais do grupo controle tiveram seus máximos valores de parasitemia, 6890 e 6600 parasitos por RBCs, nos dias 10 e 12, respectivamente como pode ser observado na figura 22. Já no caso dos animais mais protegidos tais valores máximos foram de 1040 para o animal 785 ao décimo dia e 2300 para o animal 797 no décimo quarto. Em relação aos outros integrantes do grupo imunizado, estes atingiram seus valores mais altos (4000 parasitos o indivíduo 015; 4200 o 105 e finalmente 5000 o 774) no oitavo dia, como pode ser observado na figura 23.

Figura 23. Análise individual das parasitemias atingidas nos primatas desafiados com o parasito *P. vivax* Sal-I. A parasitemia foi avaliada cada dois dias até o dia 56 por coloração de Giemsa.



A parasitemia, tanto no caso do controle como do PPAmix, tiveram uma duração entre 14 e 18 dias, iniciando-se no sexto dia e no segundo, respetivamente. Como pode ser observado na **Figura 24** e na **Tabela 8**, apesar da falta de suporte estatístico que indique significância matemática para as diferenças observadas na parasitemia, é de grande interesse a constatação de que 3 animais do grupo imunizado não tiveram ressurgimento da Parasitemia depois do dia 20, enquanto todos os animais do grupo controle tiveram. Isto indica uma interferência da resposta imune vacinal no ciclo de vida do parasito, assim como uma possível capacidade protetora, que poderia levar ao controle dos sintomas da doença. Ressurgimentos parecidos já foram observado em estudos prévios realizados em primatas não humanos (ARÉVALO-HERRERA et al., 2005).

Figura 24. Média dos valores de parasitemia atingidos nos primatas não humanos desafiados com o parasito *P. vivax* Sal-I. A parasitemia foi avaliada cada dois dias até o dia 56 por coloração de Giemsa. A área sob a curva (AUC) foi calculada mediante o método dos trapézios. Na cor verde é apresentado os valores obtidos para os animais imunizados, e no azul para os controles negativos.



Tal ressurgimento foi maior no grupo controle, com valores de até 1700 no indivíduo 596, e com duração de até seis dias. Já no caso do grupo

imunizado, tal ressurgimento do parasito só foi observado nos indivíduos 015 e 105 com similar duração de tempo que o observado no grupo controle, porém com valores máximos de 200 em ambos indivíduos.

Tabela 8. Valores das médias das parasitemias observadas nos primatas não humanos desde o dia do desafio até 36 dias depois.

Grupos	Dias	Média	Grupos	Dias	Média
CTRL (-)	0	0 ± 0,0	IMUNIZ	0	0 ± 0,0
	2	25 ± 50,0		2	140 ± 151,66
	4	75 ± 150,0		4	1000 ± 959,17
	6	482,5 ± 181,36		6	2124 ± 1537,22
	8	1337,5 ± 970,92		8	2804 ± 2217,93
	10	3975 ± 2601,77		10	2684 ± 1192,34
	12	2780 ± 2851,75		12	1666 ± 744,43
	14	1852,5 ± 507,63		14	1236 ± 789,86
	16	1825 ± 492,44		16	690 ± 652,15
	18	990 ± 165,165,5		18	364 ± 177,43
	20	800 ± 141,42		20	320 ± 164,32
	22	0 ± 0,0		22	0 ± 0,0
	24	750 ± 645,5		24	80 ± 109,54
	26	825 ± 713,56		26	80 ± 109,54
	28	275 ± 95,74		28	40 ± 54,77
	30	307,5 ± 67,01		30	30 ± 44,72
	32	0 ± 0,0		32	10 ± 22,36
34	0 ± 0,0	34	0 ± 0,0		
36	0 ± 0,0	36	0 ± 0,0		

As nossas observações estão de acordo com a extensa literatura existente na área de desenvolvimento de vacinas antimaláricas, onde foi repetidamente mostrado que os anticorpos com capacidade protetora precisam de uma resposta celular e de citocinas intensa e simultânea para ter a eficácia suficiente. Assim, no nosso estudo dois dos três principais produtores de anticorpos, 015 e 774, sofreram as maiores parasitemias no grupo PPAmix com áreas por embaixo da curva (AUC) de 33,98 e 41,84, respectivamente.

O reconhecimento dos parasitos por IFAT, por outro lado, demonstrou ter uma relação direta com a proteção apresentada, com exceção dos primatas 015 e 785, que mostraram. Porém, devido à similaridade entre os títulos IFAT estimulados nos grupos controle e experimental, pode se sugerir que só alguns dos antígenos foram os responsáveis pela proteção, enquanto que os outros antígenos contribuem para a geração de altos títulos de anticorpos totais mas não possuem capacidades protetoras significativa.

As nossas observações sugerem dessa maneira que seja considerado um biomarcador de maior importância o IFN- γ do que os títulos absolutos de anticorpos, no aguardo de futuras definições de quais dos 4 antígenos induzem os anticorpos com relação direta com a proteção na nossa formulação. É intenção do nosso grupo de pesquisa incluir também nessa formulação outros antígenos que participem de vários estágios do ciclo de vida do parasito e que sejam alvo de respostas celulares além de humorais .

Baseados nestes resultados se pode concluir, que o controle da parasitemia esteve altamente vinculado com o reconhecimento do parasito na imunofluorescência e com a secreção do IFN- γ e em menor grau com a presença de anticorpos totais por ELISA. Esta conclusão, também explicaria a ausência do ressurgimento da parasitemia no dia 22, já que assim como nos indivíduos controle os primatas não humanos 105 e 15 secretaram baixa concentração desta citocina.

Tal conclusão também poderia explicar a proteção ao ressurgimento, observado na cinética da parasitemia, já que no dia 28 como foi observado na Figura 18, os indivíduos atingiram a capacidade máxima de reconhecimento do parasito

Nesta área, diversos estudos além de ter demonstrado a importância do IFN- γ no combate contra o esporozoítio do parasito, tem descrito a importante função desta citocina no controle dos merozoítos (STRUICK; RILEY, 2004; MCCALL; SAUERWEIN, 2010) em conjunto com os anticorpos específicos (VALDERRAMA-AGUIRRE et al., 2005). Estes estudos corroborariam com os atuais resultados obtidos.

A apresentação das médias de parasitemia observadas na Figura 23, nos permite concluir que apesar de não ter sido analisado um alto número de indivíduos, se observou uma tendência protetora do candidato vacinal ao diminuir o valor máximo da parasitemia atingida, a quantidade de parasitos acumulado durante a mesma e finalmente ao diminuir o valor de AUC.

Contudo, as parasitemias não tiveram valores homogêneos nos diferentes elementos de cada grupo, não se observou diferenças significativas estes. Este mesmo fenômeno foi observado em outro estudo com primatas não humanos (OBALDIA et al., 2017). Neste estudo, Obaldia et al. (2017), observaram que no dia 35, os candidatos vacinais formulados com os antígenos AMA1 e MSP1₄₂, reduziram quase totalmente a parasitemia. A partir deste resultado, se poderia concluir que tais antígenos possuem o suficiente potencial protetor contra o parasito na fase eritrocítica.

4 CONCLUSÕES

- Os candidatos vacinais formulados com os quatro antígenos (PvDBP-II-MT, PvDBP-II-PA, PvAMA1 e Pv MSP1₁₉) sob protocolos heterólogos PPA estimularam de forma intensa, porém heterogênea a síntese de anticorpos IgG específicos nos primatas não humanos imunizados.
- Os anticorpos estimulados pelas imunizações tiveram uma relação direta com o número de imunizações e com o tempo.
- Os antígenos que estimularam a maior quantidade de anticorpos específicos foram AMA1, seguido por MSP1₁₉, DBP-II-MT e finalmente DBP-II-PA.
- Os anticorpos presentes nos soros dos primatas não humanos imunizados foram capazes de reconhecer as formas sanguíneas do parasito em testes *in vitro* por IFAT. Porém tal reconhecimento não foi igual em todos os indivíduos.
- A capacidade dos anticorpos de reconhecer os parasitos eritrocitários não teve diferença significativa após as três imunizações. A imunização com Pmix foi ligeiramente superior à estimulada por PPMix e inferior a PPAmix. Porém os maiores títulos de imunofluorescência foram observados após o desafio.
- O segundo reforço, rAdmix, não estimulou diferenças significativas entre os títulos de imunofluorescência, nem nos IgG específicos sendo que uma possibilidade para sua ineficiência pode ser que o método de transporte dos adenovírus do Brasil até a Colômbia não foi o adequado.
- O aperfeiçoamento do método de administração dos adenovírus recombinantes, assim como do seu transporte, permitirá uma maior homogeneidade dos resultados obtidos, podendo vir a aumentar a proteção após o desafio.
- As capacidades dos anticorpos de reconhecer os esquizparasitos eritrocitários no grupo experimental e no controle não tiveram diferença estatística após o desafio.
- A falta de relação entre os títulos das citocinas com respeito ao tempo e as imunizações, apesar de ter sido comprovado uma relação direta entre os títulos de IgG com estas variáveis, nos permite concluir que

a análise dos títulos das citocinas por CBA não foi o suficientemente sensível para comprovar as diferenças após cada imunização

- Apesar das diferenças observadas no número de spots formados por IFN- γ não levar a significância estatística estes valores aumentaram após cada imunização.
- O candidato vacinal aumentou os números de spots formados por IFN- γ , porém devido a utilização de animais com background genético misturado, não foi possível obter o suporte matemático a este aumento.
- O controle da parasitemia foi favorecido pelo poder de reconhecimento dos anticorpos presentes nos soros, assim como pelo IFN- γ e em menor grau pela presença de IgG específicos, como pode ser observado nos indivíduos 785 e 797.
- Apesar de não ter um suporte estatístico que indique diferenças na parasitemia entre os grupos, é importante mencionar que três dos cinco animais imunizados não tiveram o ressurgimento da parasitemia depois do vigésimo dia. Isto indica uma interferência da resposta imune vacinal no ciclo de vida do parasito, assim como uma possível capacidade protetora, que poderia levar ao controle dos sintomas da doença.

REFERÊNCIAS

AMERI, M. Laboratory diagnosis of malaria in nonhuman primates. **Veterinary Clinical Pathology**, v.39, n.1, p.5-19, 2010.

ARÉVALO-HERRERA, M.; CASTELLANOS, A.; YAZDANI, S. S.; SHAKRI, A. R.; CHITNIS, C. E.; DOMINIK, R.; HERRERA, S. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant vaccine based on the receptor-binding domain of the *Plasmodium vivax* duffy binding protein in aotus monkeys. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.73, n.5, p.25-31, 2005.

BOUILLET, L. É. M.; DIAS, M. O.; DORIGO, N. A.; MOURA, A. D.; RUSSELL, B.; NOSTEN, F.; RENIA, L.; BRAGA, É. M.; GAZZINELLI, R. T.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S.; BRUNA-ROMERO, O. Long-Term Humoral and Cellular Immune Responses Elicited by a Heterologous *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 Protein Prime/Adenovirus Boost Immunization Protocol. **Infect Immun**, v.79, n.9, p.3642-3652, 2011b.

CULLETON, R. L.; FERREIRA, P. E. Duffy Phenotype and *Plasmodium vivax* infections in Humans and Apes, Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.10, p.1704-1705, 2012.

CUNHA, M. G.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, I. S. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP119 expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine**, v.20, n.3, p.385-396, 2001.

GOLEND, C. F.; LI, J.; ROSENBERG, R. Continuous in vitro propagation of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, n.13, p.6786-6791, 1997.

LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. **Numerical Ecology**. 3th ed. Great Britain: Elsevier. 2012. 990 p.

MCCALL, M. B. B.; SAUERWEIN, R. W. Interferon- γ —central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. **J Leukoc Biol**, v.88, n.6, p.1131-1143, 2010.

OBALDIA, N.; STOCKELMAN, M. G.; OTERO, W.; COCKRILL, J. A.; GANESHAN, H.; ABOT, E. N.; ZHANG, J.; LIMBACH, K.; CHAROENVIT, Y.; DOOLAN, D. L.; TANG, D.-C. C.; RICHIE, T. L. A *Plasmodium vivax* Plasmid DNA- and Adenovirus-Vectored Malaria Vaccine Encoding Blood-Stage Antigens AMA1 and MSP142 in a Prime/Boost Heterologous Immunization Regimen Partially Protects Aotus

Monkeys against Blood-Stage Challenge. **Clin Vaccine Immunol**, v.24, n.4, 2017.

ROOBSONG, W.; THARINJAROEN, C. S.; RACHAPHAEW, N.; CHOBSON, P.; SCHOFIELD, L.; CUI, L.; ADAMS, J. H.; SATTABONGKOT, J. Improvement of culture conditions for long-term in vitro culture of *Plasmodium vivax*. **Malaria Journal**, v.14, p.297, 2015.

STRUIK, S. S.; RILEY, E. M. Does malaria suffer from lack of memory? **Immunol Rev**, v.201, n.1, p.268-290, 2004.

VALDERRAMA-AGUIRRE, A.; QUINTERO, G.; GÓMEZ, A.; CASTELLANOS, A.; PÉREZ, Y.; MÉNDEZ, F.; ARÉVALO-HERRERA, M.; S., H. Antigenicity, immunogenicity, and protective efficacy of *Plasmodium vivax* MSP1 PV2001: a potential malaria vaccine subunit. **Am J Trop Med Hyg**, v.73, n.5, p.16-24, 2005.

CAPÍTULO III:
Construção de um candidato vacinal
baseado da região M2 da proteína
PvMAEBL

1 APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

No presente capítulo é apresentado o procedimento seguido para a obtenção da sequência codificadora da região da proteína MAEBL do *P. vivax* (PvMAEBL-M2), assim como a obtenção de um rHAd com capacidade de expressar essa proteína em células eucariotas, (rHAdMAEBL-M2).

Mostramos também a seguir, a proteção cruzada em camundongos C57BL/6, imunizados com tais rHAd e desafiados com *P. yoelii*.

Finalmente, como produto desta pesquisa, mostramos no ANEXO o pedido de patente denominada:

“SEQUÊNCIA GENÉTICA MODIFICADA DA PROTEÍNA MAEBL DE *PLASMODIUM VIVAX* E APLICAÇÃO DO PRODUTO DA SUA EXPRESSÃO COMO ANTÍGENO DE VACINAÇÃO CONTRA MALÁRIA HUMANA MEDIADA POR VETORES RECOMBINANTES”.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Construção de um novo recombinante baseado da região M2 da proteína PvMAEBL

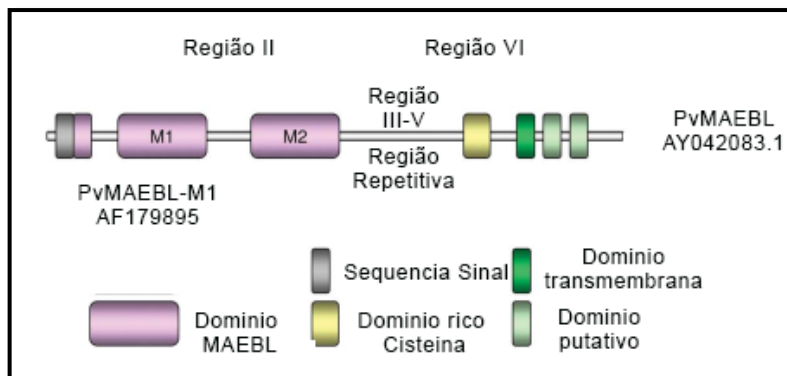
Baseado na baixa síntese de anticorpos contra os antígenos PvDBP-II-MT, PvDBP-II-PA, AMA1 e MSP1₁₉, assim como no limitado grau de proteção obtido nos primatas não humanos imunizados, construiu-se um novo candidato vacinal baseado na região M2 da proteína parasitaria PvMAEBL.

2.1.1 Sequência do antígeno PvMAEBL-M2 construída

A fim de identificar a sequência nucleotídica da região M2 da proteína MAEBL do *P. vivax*, a sequência PvMAEBL cujo número de acesso no *GenBank* é AY042083.1, foi utilizada como referência e foi comparado com a sequência da Região M2 do *P. yoelii* (AF031886.2) estudada pela doutora Juliana Almeida Leite durante a execução de sua tese de doutoramento (LEITE, 2013; LEITE et al., 2015).

O esquema da estrutura de tal proteína é mostrado na **Figura 25**. Nesta figura pode-se observar, como a região M2 está flanqueada pela Região M1, com número de acesso no *GenBank* AF179895 e por três regiões repetitivas denominadas III, IV e V.

Figura 25. Esquema da estrutura genética da sequência nucleotídica da PvMAEBL. Esquema utilizado como padrão para o desenho do antígeno PvMAEBL-M2. Nesse esquema podem ser observadas os subdomínios M2 da Região II relacionados à junção com os eritrócitos.



Fonte. Adaptado de: (TOLIA et al., 2005).

2.1.2 Otimização da sequência codificante do antígeno PvMAEBL-M2 para sua expressão em células eucariotas

A sequência genética resultante foi traduzida com ajuda do software BLASTX, e a cadeia de aminoácidos resultante, foi utilizada como matriz para otimizar a sequência de DNA para sua expressão em células eucariotas, pelo <http://www.idtdna.com/>.

2.1.3 Construção do vetor adenoviral recombinante para o antígeno PvMAEBL-M2 e avaliação da expressão da proteína heteróloga

A construção do rHADPvMAEBL-M2 foi realizada a partir do plasmídeo pBSK-MAEBL-Ad (Genone), contendo a sequência de interesse otimizada flanqueada pelos lugares de restrição HindIII e BglII.

2.1.3.1 Geração do adenovírus recombinante com capacidade de expressão da proteína PvMAEBL-M2

O plasmídeo pBSK-MAEBL-Ad foi ressuspendido em água de injeção e multiplicado em bactérias *E. coli* XL1-Blue cálcio competente em meio LB com ampicilina.

O procedimento para a transformação das bactérias *E. coli* XL-1 Blue foi choque térmico conforme descrito por POPE & KENTE (1996). Após esta transformação, as bactérias *E. coli* XL-1 Blue, da mesma forma que

as M15 transformadas com o pAdCMV-link-1 (vetor usado para gerar o cassete de expressão proteico sob controle do promotor do CMV), foram semeadas em ágar LB suplementado com 100 mg/ml de ampicilina.

O plasmídeo foi extraído de acordo com as instruções do fabricante mediante o *PureYield™ Plasmid Midiprep System* – (Promega Corporation).

O pBSK-MAEBL-Ad assim como o pAdCMV-link-1, foram digeridos com as enzimas de restrição HindIII e BglII e os fragmentos de interesse (plasmídeo e inserto) foram purificados a partir do gel com 1% agarose com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega Corporation) e unidos pelos extremos coesivos em presença de 10 U T4 DNA ligase (Biolabs), 50 mM, Tris-HCl, 10 mM, MgCL₂, 10 mM DTT e 1 mM ATP a 16 °C durante 16 h para obter o plasmídeo de transferência pCMV-PvMAEBL-M2.

O plasmídeo resultante foi novamente multiplicado em *E. coli* XL1- Blue, extraído pelo *Kit PureYield™ Plasmid Miniprep System* e finalmente co-transfectado com pJM17, contendo o genoma adenoviral, em células HEK 293.

2.1.3.2 Avaliação da expressão das proteínas do rHAdMAEBL-M2 em células HEK293

Após a produção, multiplicação e titulação do rHAdMAEBL-M2 em células HEK 293, este adenovírus foi testado mediante análises da identidade adenoviral por PCR, assim como mediante a análise da reatividade dos soros de pacientes infectados com malária causada por *P. vivax* e camundongos desafiados com *P. yoelii*.

Primeiro, alíquotas do rHAdMAEBL-M2 purificados foram utilizadas para a infecção de novas células HEK 293A cultivadas em placas de cultura de 6 poços. Após sete dias foram retiradas todas as células que apresentaram efeito citopático e o material genético foi extraído utilizando-se o kit comercial *AllRep DNA/RNA/Protein Mini kit* (Qiagen, CA, USA), de acordo as instruções do fabricante.

O DNA purificado foi amplificado por PCR, utilizando os *primers* específicos para a porção da proteína hexon descritos por Allard *et al.* (1992) **Tabela 9**, fracionado por eletroforese em gel de agarose 1 % em TAE 1x, acrescido com Gelred (Biotium), sob voltagem de 100 V, visualizado em luz U.V. de 320 nm e fotografado (Fotodocumentador Chemidoc MP- Bio-rad).

Tabela 9. *Primers* utilizados para a verificação da identidade adenoviral do rHAdMAEBL-M2.

Primers	Sequência
1- nexAA1893	5'GCCACCGAGACGTACTTCAGCCTG3'
2- nexAA1905	5TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCG GTC3'

A seguir, às proteínas extraídas das células HEK 293 infectadas adicionaram-se 150 µL de Tampão de lise (2 % SDS; 5 % β-mercaptoetanol; 0,125 M Tris-HCl pH 7,4; 30 % de glicerol; 1,5 % inibidor de proteases). Esse extrato celular foi fervido durante 5 min a 99 °C, centrifugado a 10.000 g por 10 min, a 4 °C e armazenado a -20 °C até ser avaliado.

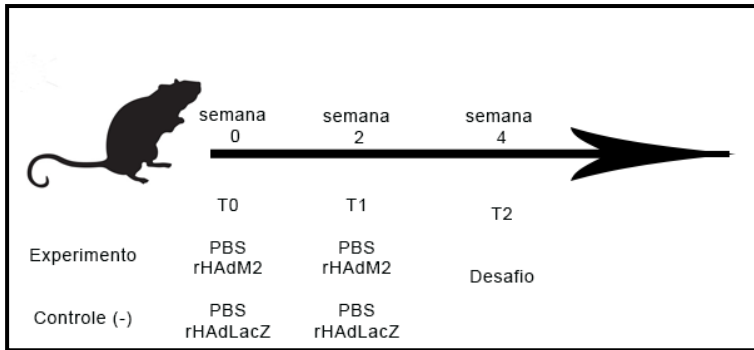
As avaliações em gel SDS-PAGE 12% e *Western Blot*, foram realizadas a partir de 30 µL das amostras (aprox. 5 µg de proteínas total segundo o método clássico de Bradford (BRADFORD, 1976) como já foi descrito anteriormente, utilizando como anticorpos primários soros de pacientes infectados com malária causada por *P. vivax* e soros de camundongos imunizados com PyMAEBL-M2 em PBS-T enriquecido com 5 % BSA e 0,05 % Azida de Sódio. Como anticorpo secundário, foi empregado o relativo à origem do anticorpo primário: IgGAM anticamundongo (Sigma) e IgGAM antihumano (Sigma), todos diluídos 1:5.000 em PBS-T contendo 2% de leite desnatado.

2.2 Determinar a capacidade de proteção cruzada do antígeno PvMAEBL-M2 administrado por rHAdMAEBL-M2 a camundongos C57BL/6

A capacidade de proteção *in vivo* dos rAdHMAEBL-M2 foi avaliada pelo teste piloto em camundongos C57BL/6 com o *P. yoelii* YM cedidos gentilmente pelo Professor Doutor Fabio Trindade Maranhão Costa da UNICAMP.

Brevemente, cinco camundongos fêmeas de oito semanas de vida foram distribuídos em dois grupos (dois animais no grupo controle e três animais no grupo experimental), e imunizados por via subcutânea cada duas semanas com 100 µL de PBS contendo o vetor viral 10⁹ UFP de rHAdMAEBL-M2 (rHAdM2) ou Controle (-) (AdCtrl), previa coleta de sangue, de acordo a **Figura 26**.

Figura 26. Esquema de imunização utilizado na avaliação do candidato vacinal formulado com a proteína PvMAEBL-M2. Na parte superior pode ser observado o esquema vacinal utilizado no presente trabalho. Cinco camundongos foram separados em dois grupos (dois controles negativos e três experimentais) e imunizados via subcutânea no dia zero (Dose) e duas semanas após da dose (Reforço 1) com 10^9 PFU/animal de rHAdLacZ (Controle) ou rHAdM2 (Experimental). Finalmente, os grupos foram desafiados via intraperitoneal com 10^5 das formas sanguíneas do *P. yoelii* cepa letal YM. As coletas de amostras foram realizadas antes de cada imunização e do desafio, assim como sete dias após o mesmo. Na parte inferior estão descritas as formulações empregadas tanto na dose como no reforço, para os grupos Controle e Experimental.



Devido à impossibilidade de desafiar os camundongos com *P. vivax*, após duas semanas da segunda imunização, cada animal foi desafiado com 10^5 *P. yoelii* em fase sanguínea pela via intraperitoneal.

A capacidade de proteção cruzada dos rHAdPvMAEBL-M2 contra as formas sanguíneas do *P. yoelii* foi qualificada pelos níveis de parasitemia e sobrevivência obtidos. A parasitemia foi mesurada a partir de uma gota de sangue da cauda dos animais infectados em esfregaços corados com Giemsa. A porcentagem de parasitemia foi determinada calculando-se o número de parasitos em fase sanguínea por 1000 eritrócitos.

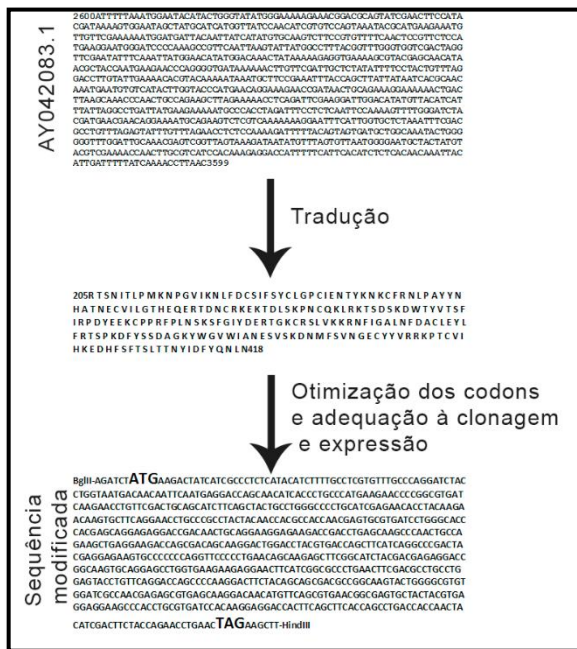
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Construção do vetor adenoviral recombinante para o antígeno PvMAEBL-M2

A sequência codificadora da proteína PvMAEBL possui sete regiões, similarmente às proteínas DBP-II. Diversos estudos têm demonstrado que a região II, especificamente os setores M1 e M2, estão envolvidos na invasão de eritrócitos, hepatócitos e glândulas salivares (KAPPE et al., 1998; NOE; ADAMS, 1998; KARIU et al., 2002).

O antígeno PvMAEBL-M2, construído para o presente trabalho, baseou-se na sequência compreendida entre os nucleotídeos 2600-3599 do gene *maebl* do *P. vivax* (Genbank, Accession number AY042083.1) otimizada para sua expressão em células eucariotas segundo pode ser observado na **Figura 27**.

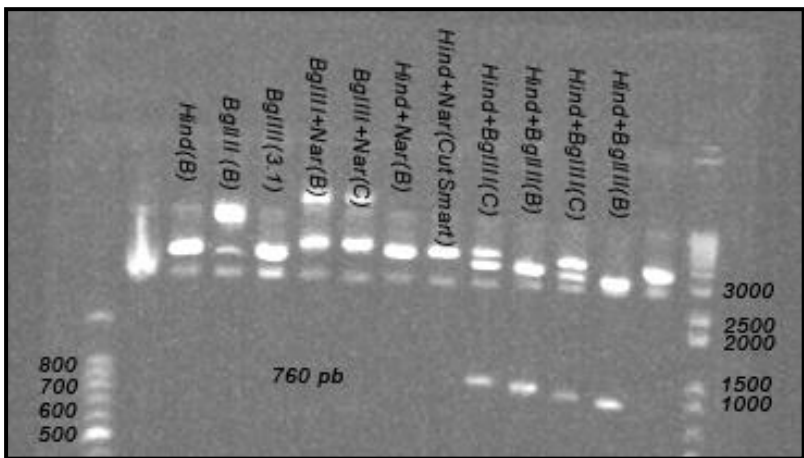
Figura 27. Obtenção da sequência otimizada para sua expressão em células eucariotas do antígeno baseado na região M2 da proteína PvMAEBL.



Tal sequência otimizada foi inserida num plasmídeo denominado pBSK-MAEBL-Ad, e este foi utilizado para transformar as bactérias *E. coli* XL-1, nas quais foi multiplicado.

Imediatamente após a transformação das bactérias células competentes, foi conferida a presença da região de interesse de aproximadamente 760 pb no plasmídeo pBSK-MAEBL-Ad por digestão enzimática com as enzimas HindIII e BglII em Buffer B ou C, como pode ser observado na **Figura 28**. Como controle negativo a digestão foi acompanhada por material genético na ausência de enzimas digestivas.

Figura 28. Digestão do plasmídeo pBSK-MAEBL-Ad com as enzimas HindIII, BglII e Nar. A imagem mostra a fotografia do gel de agarose resultante da digestão do plasmídeo portador da sequência otimizada. A banda de interesse pesa aproximadamente 760 pb. PM = padrão de peso molecular 1 Kb Promega Corp Ltda.



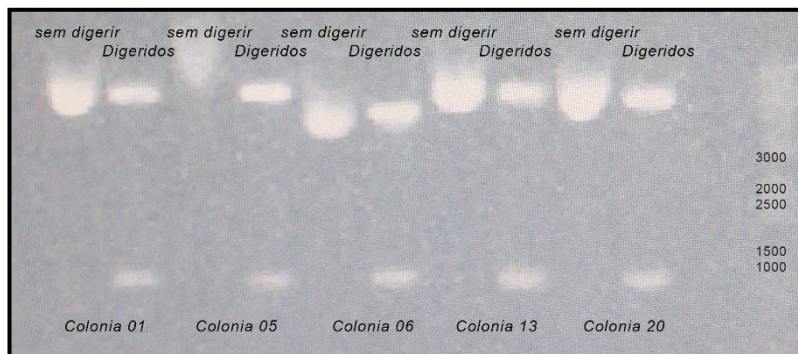
Como é mostrado na Figura 25, a banda de interesse de aproximadamente 760 pb, só esteve presente nas amostras digeridas com as enzimas HindIII e BglII na presença do Buffer B ou C. Assim mesmo, pode ser observado pequenas diferenças entre os quatro fragmentos obtidos, o que poderia indicar algum artifício durante a eletroforese ou, alternativamente, pequenas diferenças entre estas, por este motivo foi selecionada para continuar o presente trabalho aquela colônia com o número de pares de bases mais próximo ao esperado.

Após a confirmação da presença da banda de interesse, esta foi retirada e purificada do gel de Agarose com auxílio do *kit GeneClean*, de acordo o

protocolo descrito anteriormente, e ligada ao plasmídeo pAdCMV-link-1, para a obtenção do plasmídeo de transferência pAdCMV-PvMAEBL-M2.

A fim de se determinar a correta inserção do fragmento no plasmídeo pAdCMV-link 1, os clones foram digeridos novamente com as enzimas HindIII e BglIII e analisados em gel de 1 % Agarose, conforme demonstrado na **Figura 29**.

Figura 29. Digestão enzimática do plasmídeo de transferência pAdCMV-PvMAEBL-M2. A imagem mostra a fotografia do gel de agarose resultante da digestão ou não dos plasmídeos de transferência pAdCMV-PvMAEBL-M2, obtidos a partir das colônias bacterianas 01, 05, 06, 13 e 20. A banda de interesse (760 pb) se apresenta somente naqueles plasmídeos digeridos (linhas 2, 4, 6, 8 e 10). PM = padrão de peso molecular 1 Kb Promega Corp Ltda. Análises dos clones digeridos ou não com as enzimas de restrição HindIII e BglIII mostraram que os plasmídeos pAdCMV-PvMAEBL-M2 (Figura 35, linhas 2, 4, 6, 8 e 10) apresentaram um fragmento de 760 pb, demonstrando a geração do novo plasmídeo.



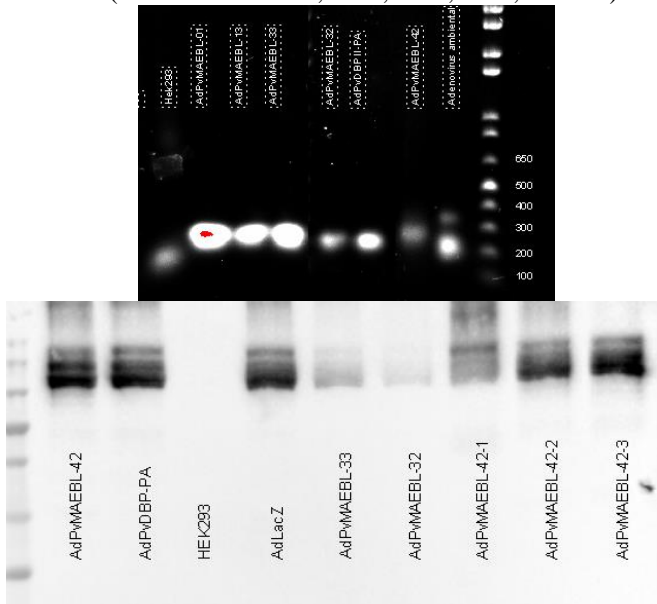
3.1.1 Verificação dos rHAdMAEBL-M2 construídos nas células HEK293

A presença do rHAd foi inicialmente corroborada pela formação de placas de lise nos poços com as culturas celulares HEK 293. Como controle negativo, em cada placa cultivou-se um ou mais poços com os cristais de fosfato de cálcio sem os respectivos plasmídeos.

Com o intuito de comprovar a transcrição dos RNAm da proteína PvMAEBL-M2 nos poços que apresentaram placas de lise, foram feitas análises por meio de PCR. Para ver a expressão das proteínas, extratos de

células HEK293 infectadas foram analisadas pelo ensaio de SDS-PAGE, como pode ser observado na **Figura 30**.

Figura 30. Análises da expressão das sequências proteicas em culturas de células HEK 293 por gel de PCR e por *Western Blot*. (Superior) DNA extraído das culturas celulares, com o *kit comercial AllRep DNA/RNA/Protein*, e os segmentos das proteínas hexon foram amplificados por PCR. A imagem mostra a fotografia do gel de agarose resultante da ampliação destes segmentos revelados sob luz UV em presença de Gelred. Ctrl (-) (células HEK 293 sem infectar), Ctrl (+) (rHAdPvDBP-II-PA e ambiental), Adenovírus recombinantes (AdPvMAEBL-01, 13, 32, 33 e 42). (Inferior) Proteínas presentes nas alíquotas do extrato celular, extraídas com tampão de lise e avaliadas em gel SDS-PAGE 12% e *Western Blot*. Como anticorpos primários foram utilizadas diluições 1:1000 de soros de pacientes infectados com *P. vivax* e soros de camundongos imunizados com PyMAEBL-M2, e como anticorpos secundários 1:1000 IgGAM anti-camundongo (Sigma) e IgGAM anti-humano (Sigma). Ctrl (-) (células HEK 293 sem infectar), Ctrl (+) (AdLacZ, rHAdPvDBP-II-PA e ambiental), Adenovírus recombinantes (AdPvMAEBL-42, 42-1, 42-2, 42-3, 32 e 33).



Na parte superior da Figura 30 pode ser observado como os cinco diferentes rHADMAEBL-M2 (01, 13, 32, 33 e 42) construídos, apresentaram uma banda similar aos controles positivos na análise por PCR. Assim mesmo, os rHAD (32, 33 e 42) mostraram bandas proteicas típicas dos adenovírus, como pode ser observado no gel SDS-PAGE, na parte inferior da Figura 30.

A presença de tais bandas sugeriria a correta montagem viral dentro das células infectada. Como controle negativo e positivo foram utilizados os extratos das células HEK293 sem infectar e infectadas com rHAD (LacZ, ambiental ou rHADPvDBP-II-PA), respectivamente.

Após ter confirmado a geração do rHADMAEBL-M2, foi testada a capacidade protetora de tais adenovírus mediante o esquema de imunização descrito na Figura 26.

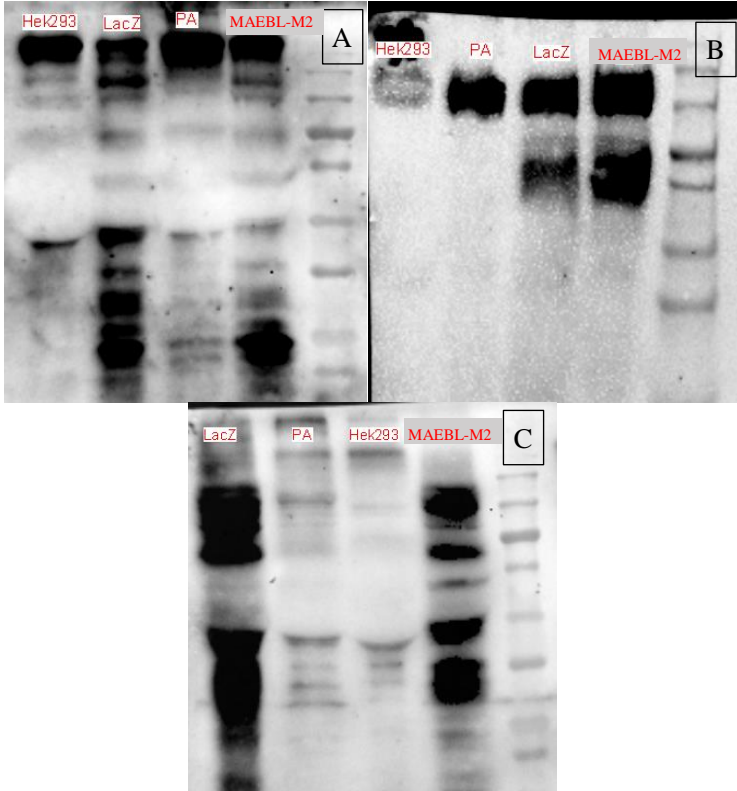
3.1.2 Avaliação do reconhecimento das proteínas recombinantes expressadas nas células HEK293

O reconhecimento das proteínas recombinantes PvMAEBL-M2, sintetizadas nas células HEK293, pelos soros de camundongos imunizados com rHAD-DBP-II-PA e MT ou PyMAEBL-M2 (cedidos gentilmente pela Doutora Juliana Almeida Leite), assim como os provenientes dos pacientes infectados com malária vivax foi avaliado por *Western Blot*. Estes resultados podem ser visualizados na **Figura 31**.

Como mostrado na Figura 31 (A, B e C), as proteínas características dos adenovírus foram reconhecidas nos ensaios de *immunoblot* pelos três soros utilizados. Isto, pode ser consequência de uma exposição prévia a este vírus, que se encontra muito difundido globalmente. Ainda nesta figura, nas seções A e B, é interessante ver que os soros dos pacientes e dos camundongos imunizados com as PvDBP-II-MT e PA, respectivamente, não reconheceram as proteínas DBP-II, o qual poderia indicar que esta proteína se encontrou em baixas concentrações nas culturas celulares ou, que os soros não possuíam suficiente concentração de anticorpos contra esta proteína.

Da mesma forma, pode se observar que os anticorpos contra a proteína PyMAEBL-M2, presentes nos soros dos camundongos imunizados, não tiveram um reconhecimento cruzado da proteína MAEBL-M2 do *P. vivax*. Esta falta de reconhecimento cruzado poderia ser explicada, de igual maneira, pela baixa concentração da proteína MAEBL-M2 nas culturas celulares HEK293 infectadas com o rHADMAEBL-M2.

Figura 31. Imagens de *Western Blot* mostrando o padrão de bandas proteico do rHAdPvMAEBL-M2 expresso em células HEK293. Anticorpo primário: 1:1000 (A) Soro de paciente com malária vivax. (B) Soro camundongo imunizado com rHAdDBP-II MT e PA. (C) Soro camundongo imunizado com PyMAEBL-M2. Anticorpos secundários 1:1000 IgGAM anticamundongo (Sigma) e IgGAM antihumano (Sigma). Ctrl (-) (HEK 293 sem infectar), Ctrl (+) (AdLacZ e rHAdPvDBP-II-PA). Adenovírus recombinantes (MAEBL-M2, ~60KDa).



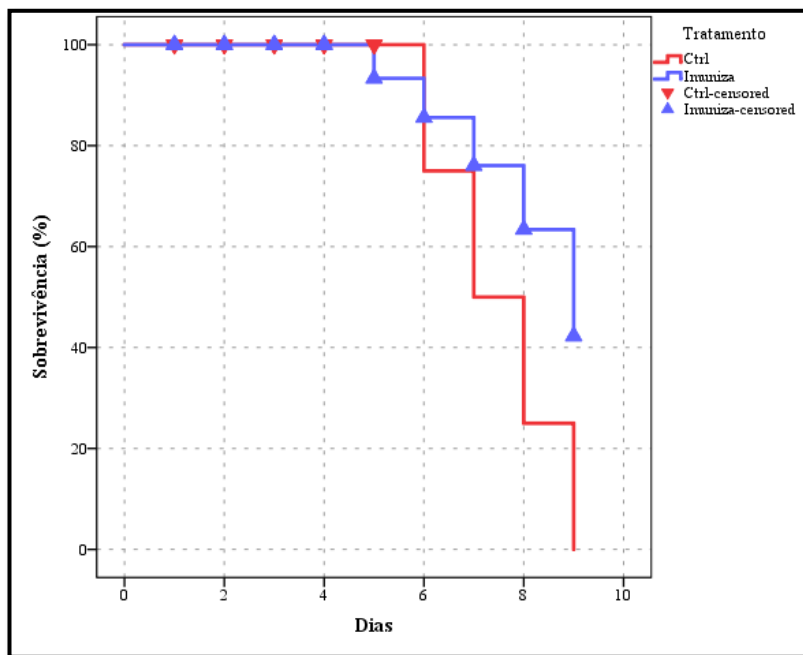
3.2 Determinar a capacidade protetora dos candidatos vacinais em camundongos C57BL/6

P. yoelii YM é um modelo murino rígido para testar a eficiência de vacinas contra malária devido à alta virulência desta linhagem.

Camundongos C57BL/6 imunizados pelo protocolo homólogo com o rHADMAEBL-M2 foram desafiados via intraperitoneal com 10^6 formas sanguíneas da cepa letal YM do parasito *P. yoelii*. Como mostrado na **Figura 30**, pela análise de Sobrevivência de Kaplan-Meier a partir dos dados obtidos, 40% dos animais imunizados e 100% dos controles negativos sucumbiram após nove dias.

As análises de sobrevivência de Kaplan-Meier caracteriza-se por estimar o tempo de sobrevivência de indivíduos que não atingiram o evento, no caso a morte, se denominando observações censuradas (GOEL et al., 2010). Tais resultados concordaram quanto ao número de sobreviventes observados após nove dias do desafio. Porém, diferiram quanto aos tempos nos quais aconteceram tais fenômenos sendo observada uma sobrevivência de 66,66% dos animais imunizados a partir do quinto dia, e óbito de todos os controles a partir do quinto dia.

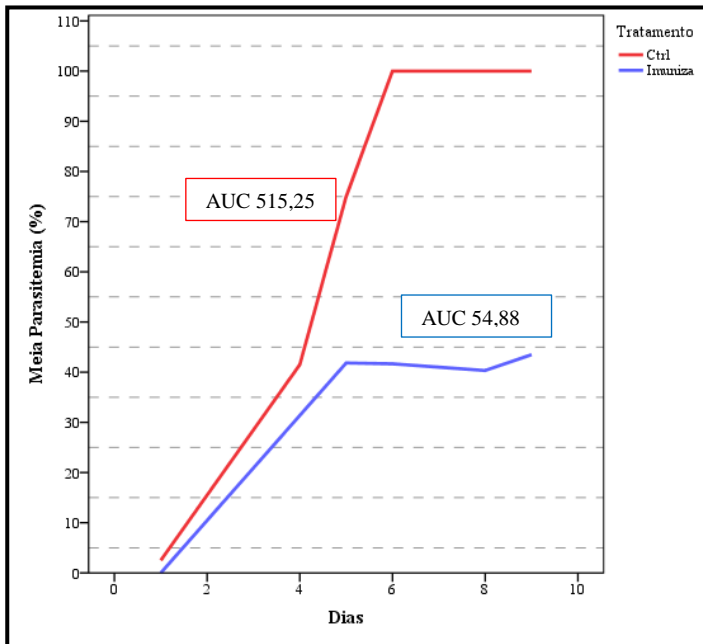
Figura 32. Análises de sobrevivência de Kaplan-Meier dos animais desafiados com *P. yoelii* YM dose letal.



Ainda, durante o desafio letal a parasitemia dos animais foi monitorada cada dois dias por meio de esfregaços sanguíneos preparados com 5 μ l de sangue obtidos da cauda dos animais. Como pode ser observado na **Figura 31**, animais do grupo controle apresentaram altos níveis de parasitemia atingindo rapidamente 100% seguido pela morte após seis dias. Já os animais imunizados sobreviventes foram capazes de controlar a infecção reduzindo a parasitemia a 15%, aproximadamente.

Esta proteção, está de acordo com o recente estudo realizado em camundongos C57BL/6 desafiados com o mesmo parasito, mas vacinados com o antígeno PyMAEBL-M2 (LEITE, 2013; LEITE et al., 2015).

Figura 33. Gráfico das médias das porcentagens de eritrócitos infectados nos animais desafiados com *P. yoelii* YM dose letal com respeito ao tempo. A parasitemia foi avaliada diariamente até o sétimo dia por meio da coloração de Giemsa. A área sob a curva (AUC) foi calculada mediante o método dos trapézios.



Os dados de proteção aqui apresentados correspondem a um experimento piloto, onde se aproveitaram cinco camundongos divididos em dois grupos. Contudo, como pode ser observado na Figura 31, se conclui que os rHAdMAEBL-M2 conferiram uma evidente proteção aos camundongos imunizados durante os nove dias avaliados, mantendo os eritrócitos infectados em menos de 15%.

Mesmo assim, tal proteção indicaria que os soros dos camundongos imunizados com o antígeno PvMAEBL-M2 tiveram uma proteção cruzada contra o *P. yoeli*, provavelmente por causa da alta homologia entre esta proteína e a PyMAEBL-M2.

Este novo antígeno poderia, possivelmente, aumentar seus níveis de imunogenicidade, se fosse administrado como proteínas purificadas em protocolos de vacinação homólogo ou heterólogos intercalado com outros vectores recombinantes. Infelizmente estas novas avaliações, assim como a quantificação por ELISA dos anticorpos estimulados, não puderam ser realizadas devido a limitações de tempo, e à falta da proteína PvMAEBL-M2 purificada. Entretanto, já foi solicitado o pedido de patente da sequência genética modificada que codifica esta proteína, que nos permitirá produzir novos vectores recombinantes e testa-los em diversas formulações vacinais. Outras importantes vantagens do presente antígeno, é a possibilidade de ser testado *in vitro* ou *in vivo* em primatas humanos e não humanos, assim como possuir 64 % de homologia com a proteína PyMAEBL, 68% *P. knowlesi e coatneyi* e 72% com PvMAEBL, EBP1.

A partir dos dados obtidos e da participação da proteína MAEBL durante diversas etapas do ciclo do parasito, pode-se concluir que este novo antígeno possui um interessante potencial como componente de uma futura vacina antimalárica com capacidade de proteção cruzada contra diversas espécies de *Plasmodium*.

4 CONCLUSÕES

- A sequência genética modificada, apresenta um interessante potencial antigênico, por estar altamente conservado entre as diferentes espécies de *Plasmodium sp.*
- Os soros dos camundongos imunizados com as proteínas purificadas PyMAEBL-M2 ou rHAdPvDBP-II-MT e PA, não mostraram reatividade cruzada contra as proteínas PvMAEBL-M2 extraídas das células HEK293 infectadas com rHAdMAEBL-M2.
- A diminuição da parasitemia poderia indicar, que os anticorpos contra PvMAEBL-M2 sintetizados inibiram os parasitos *P. yoelii*, bloqueando desta maneira a invasão dos eritrócitos sadios.
- A sobrevivência observada após o desafio mortal com o *P. yoelii* dos animais imunizados com o antígeno PvMAEBL-M2, nos permitem concluir que existiu uma proteção cruzada entre os soros dos animais imunizados contra o parasito.
- A proteção observada pelos soros dos animais imunizados nos permite concluir que existe uma alta homologia entre as proteínas PvMAEBL-M2 recombinante e a MAEBL-M2 existente no *P. yoelii*.
- A participação do domínio M2 da proteína MAEBL durante a invasão aos eritrócitos e aos hepatócitos, assim como os altos níveis de proteção observada durante o presente trabalho, nos permite concluir que este antígeno pode ser um interessante componente de uma vacina contra malária.

REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. a rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

GOEL, M. K.; KHANNA, P.; KISHORE, J. Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. **Int J Res Ayurveda Pharm**, v.1, n.4, p.274-278, 2010.

KAPPE, S. H. I.; NOE, A. R.; FRASER, T. S.; BLAIR, P. L.; ADAMS, J. H. A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.3, p.1230-1235, 1998.

KARIU, T.; YUDA, M.; YANO, K.; CHINZEI, Y. MAEBL Is Essential for Malarial Sporozoite Infection of the Mosquito Salivary Gland. **J Exp Med**, v.195, n.10, p.1317-1323, 2002.

LEITE, J. A. **Desenvolvimento de vacinas contra plasmodium spp. baseadas em antígenos de fase sanguínea = Development of vaccines based on plasmodium spp. blood stage antigens**. 2013. 192 f. (Doutora) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2013.

LEITE, J. A.; BARGIERI, D. Y.; CARVALHO, B. O.; ALBRECHT, L.; LOPES, S. C. P.; KAYANO, A. C. A. V.; FARIAS, A. S.; CHIA, W. N.; CLASER, C.; MALLERET, B.; RUSSELL, B.; CASTIÑEIRAS, C.; SANTOS, L. M. B.; BROCCHI, M.; WUNDERLICH, G.; SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M.; RÉNIA, L.; COSTA, F. T. M. Immunization with the MAEBL M2 Domain Protects against Lethal Plasmodium yoelii Infection. **Infect Immun**, v.83, n.10, p.3781-3792, 2015.

NOE, A. R.; ADAMS, J. H. Plasmodium yoelii YM MAEBL protein is coexpressed and colocalizes with rhostry proteins. **Mol Biochem Parasitol**, v.96, n.1-2, p.27-35, 1998.

POPE, B.; KENT, H. M. High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli. **Nucleic Acids Res**, v.24, n.3, p.536-537, 1996.

TOLIA, N. H.; ENEMARK, E. J.; SIM, B. K. L.; JOSHUA-TOR, L. Structural Basis for the EBA-175 Erythrocyte Invasion Pathway of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Cell**, v.122, n.2, p.183-193, 2005.