UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Fisiopatologia

Caracterização imunológica da formulação vacinal baseada em VLP (Virus Like Particle) da Proteína Circumsporozoíta (CSP) de Plasmodium vivax.

RODOLFO FERREIRA MARQUES

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Orientadora: Profa Dra Irene da Silva Soares

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas

Caracterização imunológica da formulação vacinal baseada em VLP (Virus Like Particle) da Proteína Circumsporozoíta (CSP) de Plasmodium vivax.

RODOLFO FERREIRA MARQUES

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS.

Orientadora: Profa Dra Irene da Silva Soares

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Marques, Rodolfo Ferreira

M313c Caracterização imunológica da formulação vacinal baseada em VLP (Virus Like Particle) da Proteína Circumsporozoíta (CSP) de Plasmodium vivax. / Rodolfo Ferreira Marques. - São Paulo, 2020.

104 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas -Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).

Orientador: Soares, Irene da Silva

1. Vacina para malária. 2. Plasmodium vivax. 3. proteína circumsporozoíta. 4. nucleoproteína de caxumba. I. T. II. Soares, Irene da Silva, orientador.

Rodolfo Ferreira Marques

Caracterização imunológica da formulação vacinal baseada em VLP (*Virus Like Particle*) da Proteína Circumsporozoíta (CSP) de *Plasmodium vivax.*

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor em Ciências

Prof ^a Dr ^a Irene da Silva Soares Orientador/Presidente
1º Examinador
2º Examinador
3º Examinador

0° - DI-	-1- 0004
	70.71
São Paulo,	de 2021.

Aos meus pais, José Carlos e Edina, por sempre me estimularem a ser melhor e a buscar pelos meus sonhos. Você são pra mim o maior exemplo de honestidade, bondade, determinação e principalmente FÉ.



Conforme Officia Circular v0.40/0040 ODO/0001/DDD/04.DDC 12.00/44/40
Conforme Ofício Circular nº 19/2018-CPG/CGSI/DPB/CAPES, de 23/11/18, referente a Portaria CAPES nº 206, de 4 de setembro de 2018.
"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"
"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

Agradecimentos

Ao grande arquiteto do universo, pela existência, por ser quem sou, estar onde estou e fazer o que faço.

À Prof^a. Dr^a. Irene da Silva Soares, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, pela confiança em mim depositada e pela sua contribuição em minha formação científica. Obrigado por todo incentivo e parceria durante estes anos, sem dúvidas você me inspirou a ser melhor, por ser um exemplo de ética e comprometimento com a ciência de qualidade.

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

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, seus laboratórios, funcionários e secretárias. Obrigado, obrigado, obrigado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de doutorado, possibilitando a realização desta pesquisa.

Aos professores doutores Daniel Youssef Bargieri, Eduardo Silveira e Patrick Jack Spencer pela contribuição no momento da qualificação.

À mestre e técnica do Laboratório de Parasitologia Clínica da FCF/USP, Kátia Sanches Françoso, por toda a contribuição prestada neste trabalho, cafés, trocas de conhecimento e apoio para que eu chegasse até aqui.

Ao biotério do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo (IQ/USP) e seus funcionários, em especial a Drª Flavia, por dispor da sua área experimental para a realização dos experimentos.

Às técnicas do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) Renata Albuquerque e do Laboratório de Microbiologia da FCF/USP Fabiana Teixeira, por toda a contribuição prestada neste trabalho.

A todos os colegas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela amizade, cafés e convivência diária.

Ao Seminário Laveran & Deane de Malária, ao qual tive a magnifica oportunidade de participar e que, sem dúvidas, enriqueceu muito minha formação durante o doutorado.

Ao Prof. Dr. Rogério Amino que, além de todo suporte técnico-cientifico oferecido, me inspirou a desenvolver um pensamento mais cientifico e crítico. Não tenho dúvidas que minha paixão pela ciência ficou ainda maior após trabalhar com um cientista como você. Gratidão por ter aberto as portas do seu laboratório para mim!

Ao Institut Pasteur, Unité Infection et Immunité Paludéennes, por possibilitar a realização do meu estagio sanduiche, fornecendo toda a estrutura necessária para a realização deste trabalho. Agradeço também aos amigos brasileiros e não brasileiros

que fiz durante os meses de trabalho e que tornaram esta jornada ainda mais especial.

À Maison du Brèsil, que foi meu lar por quase 7 meses e a TODOS os amigos que fiz e que me proporcionaram momentos inesquecíveis. Muita gratidão por tudo, vocês estarão em meu coração por toda a vida.

Às amigas Luciana (Jão), Bianca (Bea) e Luciana Oliveira (amore) pelos inúmeros momentos e os mais felizes vividos em Paris. Nossa amizade é e, sempre será, muito preciosa pra mim.

À Dra Alba Marina Gimenez que, muito mais que uma mentora, se tornou uma grande amiga e companheira. Não cabem palavras aqui pra expressar o quanto nossas trocas fizeram essa jornada ser mais especial. Te quero sempre por perto!

À Janaína Novais, minha IC e amiga "fiel escudeira". Você foi peça fundamental neste trabalho.

As amigas e parceiras de laboratório Ana Caroline e Monalisa, por toda contribuição em meu trabalho e por fizerem meus dias sempre mais felizes.

À Marina de Souza Braga, pela amizade ímpar, sempre presente e apoiando minhas decisões.

À minha família, por todo carinho e apoio até aqui, vocês são fundamentais na minha vida e as pessoas que mais amo nesse mundo.

Aos meus tios Paulo e Inês por todo apoio, carinho e incentivo. Obrigado por sempre acreditarem no meu potencial.

Aos amigos Caio César, Danilo Ferreira, Gabriel Vitor, Guilherme, Laís, Luciano (tunico), Paulo Humberto, Thiago, Vivian, Viviane e Wagner, por todo apoio e pela amizade incondicional.

FERREIRA MARQUES, Rodolfo. Caracterização imunológica da formulação vacinal baseada em VLP (Virus Like Particle) da Proteína Circumsporozoíta de Plasmodium vivax. 104 páginas. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Resumo

O Plasmodium vivax é a espécie mais comum de parasita causador da malária humana encontrada fora da África, com maior endemicidade na Ásia, América Central e do Sul e Oceania. Embora o Plasmodium falciparum cause a maioria do número de mortes, o P. vivax pode levar à malária grave e resultar em morbimortalidade significativa. O desenvolvimento de uma vacina protetora será um passo importante para a eliminação da malária. Recentemente, uma formulação contendo as três variantes alélicas da proteína circumsporozoíta de P. vivax (PvCSP - All epitopes) induziu proteção parcial em camundongos após desafio com esporozoíto híbrido Plasmodium berghei (Pb), no qual as repetições centrais do PbCSP foram substituídas por repetições PvCSP-VK210 (esporozoítos Pb/Pv). No presente estudo, a proteína quimérica PvCSP contendo as variantes alélicas (VK210, VK247 e P. vivax-like) fusionadas com a proteína de nucleocapsídeo do vírus da caxumba (formando partículas semelhantes a nucleocapsídeos ou do inglês, NLP - Núcleo Like Particles) na ausência (NLP-CSP_R) ou na presença do domínio C-terminal (CT) conservado da PvCSP (NLP-CSPcT). Para a realização do estudo selecionamos os adjuvantes Poly (I:C), um RNA sintético de dupla fita, agonista do receptor Toll do tipo 3 (TLR3) ou o adjuvante Montanide ISA 720, uma emulação óleo em agua. Para obter uma forte resposta imune, a levedura Pichia pastoris foi usada para expressar as proteínas recombinantes na forma de NLPs. Camundongos foram imunizados com cada uma das proteínas recombinantes em combinação com os adjuvantes citados. Embora ambas as NLPs tenham sido capazes de gerar uma forte resposta imune, com altos níveis de títulos e longevidade, apenas a formulação contendo a proteína NLP-CSPct na presenca do adjuvante Poly (I:C) foi selecionada para ser explorada em experimentos futuros. Esta proteína em combinação com o adjuvante Poly (I:C) induziu alta frequência de células secretoras de anticorpos específicas para o antígeno homólogo nos dias 5 e 30, no baço e na medula óssea, respectivamente. Altos títulos de IgG contra as 3 variantes de PvCSP foram detectados nos soros. Posteriormente camundongos imunizados com NLP-CSPcT foram desafiados com esporozoítos Pb/Pv e a parasitemia no 5º dia demonstrou proteção estéril em 30% dos camundongos desafiados.

Portanto, a formulação vacinal gerada neste estudo tem potencial para ser explorada no desenvolvimento de uma vacina universal contra a malária causada por *P. vivax*.

Palavras-chave: Vacina para malária, *Plasmodium vivax*, proteína circumsporozoíta, nucleocapsídeo de caxumba.

FERREIRA MARQUES, Rodolfo. Immunological characterization of the VLP (Virus Like Particle) vaccine formulation fused to Circumsporozoite Protein of *Plasmodium vivax*. 104 pages. Thesis (Ph.D.) – School of Pharmaceutical Science, University of São Paulo.

Abstract

Plasmodium vivax is the most common species of human malaria parasite found outside Africa, with high endemicity in Asia, Central and South America, and Oceania. Although Plasmodium falciparum causes the majority of deaths, P. vivax can lead to severe malaria and result in significant morbidity and mortality. The development of a protective vaccine will be a major step toward malaria elimination. Recently, a formulation containing the three allelic variants of the P. vivax circumsporozoite protein (PvCSP-All epitopes) showed partial protection in mice after a challenge with the hybrid Plasmodium berghei (Pb) sporozoite, in which the PbCSP central repeats were replaced by the VK210 PvCSP repeats (Pb/Pv sporozoite). In the present study, the chimeric PvCSP allelic variants (VK210, VK247, and P. vivax-like) were fused with the mumps virus nucleocapsid protein (assembling into nucleo like particles - NLP) in the absence (NLP-CSPR) or presence of the conserved C-terminal (CT) domain of PvCSP (NLP-CSPcT). To carry out the study, we selected the adjuvants Poly (I:C), a synthetic double-stranded RNA, Toll-like receptor 3 (TLR3) agonist or Montanide ISA 720 adjuvant, an oil-water emulation. To elicit stronger immune response, Pichia pastoris yeast was used to produce the NLPs. Mice were immunized with each recombinant protein in combination with above. Although both NLPs were able to generate stronger immune response, with high antibodies titer levels and longevity, formulation containing NLP-CSPcT in the presence of Poly (I:C) was selected to be explored in future experiments. NLP-CSPct with Poly (I:C) adjuvant presented a high frequency of antigen-specific antibodysecreting cells (ASCs) on days 5 and 30, respectively, in the spleen and bone marrow. Moreover, high IgG titers against all PvCSP variants were detected in the sera. Later, immunized mice with NLP-CSP_{CT} were challenged with Pb/Pv sporozoites. Sterile protection was observed in 30% of the challenged mice.

Therefore, this vaccine formulation use has the potential to be a good candidate for the development of a universal vaccine against *P. vivax* malaria.

Keywords: malaria vaccine, *Plasmodium vivax*, circumsporozoite protein, mumps nuclecapsid.

Lista de figuras

Figura 1 - Mapa das regiões de risco para malária no mundo1
Figura 2 - Distribuição da malária na América do Sul2
Figura 3 - Ciclo do <i>Plasmodium</i> spp5
Figura 4 - Representação esquemática da Proteína CS de Plasmodium11
Figura 5 - Linha do tempo dos principais adjuvantes em estudo14
Figura 6 - Pesquisa de novos antígenos para o desenvolvimento de vacinas contra
malária16
Figura 7 - Esquema representativo das proteínas NLP-CSP _{CT} e NLP-CSP _R 26
Figura 8 - Esquema de imunização e coleta de soro para análise31
Figura 9 - Curva representativa da expressão da proteína NLP-CSP _{CT} 36
Figura 10 - Purificação das proteínas NLP-CSPcT e NLP-CSPR por cromatografia de
afinidade e troca-iônica37
Figura 11 - Cromatogramas representativos obtidos por RP-HPLC das proteínas
recombinantes NLP-CSP _{CT} e NLP-CSP _R 38
Figura 12 - Immunobloting em condições redutoras das proteínas NLP-CSP _{CT} e
NLP-
CSP _R 39
Figura 13 - Espectro de dicroísmo circular das proteínas NLP-CSP _{CT} e NLP-
CSP _R 40
Figura 14 - Caracterização das proteínas NLP-CSP _{CT} ou NLP-CSP _R por MET41
Figura 15 - Cromatografia de troca-iônica - yPvCSP-VK210, yPvCSP-VK247 e
yPvCSP-P. vivax-like e eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%42
Figura 16 - Resposta de anticorpos em camundongos imunizados com NLP-CSPc1
ou NLP-CSP _R na presença do adjuvante Poly (I:C)44
Figura 17 - Avaliação da longevidade da resposta de anticorpos IgG em
camundongos imunizados com as formulações contendo as proteínas NLP-CSPc1
ou NLP-CSP _R na presença do adjuvante Poly
(I:C)45
Figura 18 - Resposta de anticorpos em camundongos imunizados com NLP-CSPc1
ou NLP-CSP _R na presenca do adjuvante Montanide ISA 720 47

Figura	19 -	Avalia	ação (da I	longevidade	da	resposta	de	anticorpo	s IgG	em
camun	dongos	imuniz	zados	com	as formula	ções	contendo	as p	roteínas,	NLP-CS	SРст
ou	NLP-C	SP_R	na	р	resença	do	adjuva	nte	Montar	nide	ISA
720				48							
Figura	20 - R	espost	a espe	ecífic	ca de antico	rpos	(IgG) em	camu	ındongos	imuniza	ados
com a	NLP-C	SРст е	NLP-C	SPR	R						50
Figura	21 - R	espost	a espe	ecífic	ca de antico	rpos	(IgG) em	camu	ındongos	imuniza	ados
com a	NLP-C	SРст е	NLP-C	SPR	R						52
Figura	22 - (Compar	ação	da r	esposta de	antic	corpos cor	ntra p	roteínas	do vírus	s da
caxum	ba e an	tígeno	vacina	I NL	P-CSPct						54
Figura	23 - F	Respos	ta da	célu	ıla secretor	de a	anticorpos	(CS/	A) em ca	mundor	ngos
imuniz	ados co	m NLP	-CSPc	T							57
Figura	24 - <i>P</i>	Avaliaçã	ăo da	para	asitemia apo	s de	safio em	camu	ındongos	imuniza	ados
com		u	m		regim	ie		de		ref	orço
primár	io							60			

Lista de tabelas

Tabela 1 - <i>Prime-boost</i> homólogo utilizando as proteínas NLP-CSP _{CT} e NLF	² -CSP _R e
Poly (I:C) como adjuvante	31
Tabela 2 - Prime-boost homólogo utilizando as proteínas NLP-CSP _{CT} e NLP	-CSP _R e
Montanide ISA 720 como adjuvante	32
Tabela 3 - Composição da estrutura secundária das proteínas NLP-CSP _{CT} e	NLP-
CSP _R após deconvolução	40

Sumário

1. IN	FRODUÇÃO	1
1.1.	Malária no Brasil e no Mundo	1
1.2.	Ciclo do parasito	4
1.3.	Medidas de controle e prevenção	7
1.4. Malária	Considerações sobre as estratégias de desenvolvimento de vacinas cont 10	ra
1.5.	Utilização da Proteína Circumsporozoíta como antígeno vacinal	11
1.6.	Adjuvantes em vacinas	14
1.7.	Estudos clínicos envolvendo vacinas contra malária	16
1.8. forma p	Contribuições de nosso grupo para o desenvolvimento de vacina contra a pré-eritrocítica de <i>P. vivax</i>	
1.9. vacinai:	Utilização de partículas semelhantes a vírus como carreadores de antíge	
2. OE	BJETIVOS	25
3. MA	ATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1.	Sequências das proteínas recombinantes	26
3.2. express	Obtenção de leveduras <i>P. pastoris</i> transformadas com os vetores de são para as proteínas recombinantes	28
3.3.	Expressão das proteínas recombinantes a partir da levedura P. pastoris	28
3.4.	Purificação das proteínas recombinantes	29
3.5. PAGE)	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-	
3.6.	Ensaio de Immunobloting	30
3.7. NLPs	Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) d	as
3.8.	Dicroísmo Circular	32
3.9.	Microscopia eletrônica de varredura	32
3.10.	Imunização de camundongos	32
3.11. pelas ir	Dosagem de anticorpos IgG, especificidade e isotipos de IgG induzidos nunizações experimentais em camundongos	33
3.12.	ELISPOT de células B	35
3.13.	Desafio utilizando parasitos transgênicos	36
3.1	3.1. Parasitos, camundongos e mosquitos	36

	3.13	3.2.	Desafio com os esporozoítos	36
3.14	ŀ.	Sor	ologia contra o vírus da caxumba	37
4.	RES	SUL	TADOS:	37
4.1.		Ехр	ressão e purificação das proteínas NLP-CSP _{CT} e NLP-CSP _R	37
4.2.		Puri	ificação das proteínas NLP-CSPc⊤e NLP-CSP _R	38
4.3.		Car	acterização biofísica das proteínas NLP-CSP _{CT} e NLP-CSP _R	40
	4.3.	1.	Cromatografia líquida de alta eficiência	40
	4.3.	.2.	Immunoblotting	40
	4.3.	3.	Dicroísmo circular	41
	4.3.	4.	Microscopia eletrônica de transmissão	42
4.4.		Car	acterização imunológica das proteínas NLP-CSP _{CT} e NLP-CSP _R	43
			Expressão das variantes alélicas VK210, VK247 e <i>P. vivax</i> like utilizada este de ELISA	
	NLF	P-CS	Avaliação da resposta de anticorpos em camundongos imunizados cor SP _{CT} ou NLP-CSP _R em esquema de imunização <i>prime-boost</i> homólogo ença do adjuvante Poly (I:C)	
			Determinação da longevidade dos anticorpos anti-NLP-CSPc⊤ e anti-SPR empregando Poly (I:C) como adjuvante4	47
	NLF	P-CS	Avaliação da resposta de anticorpos em camundongos imunizados cor SP _{CT} ou NLP-CSP _R em esquema de imunização <i>prime-boost</i> homólogo onado com o adjuvante Montanide ISA 720	
	imu	niza	Determinação da longevidade dos anticorpos IgG em camundongos idos com as formulações contendo as proteínas, NLP-CSP _{CT} ou NLP-emulsionadas com o adjuvante Montanide ISA 720	50
	4.4. CSI		Avaliação da resposta de isotipos de IgG anti-NLP-CSPcT e anti-NLP-	51
			Determinação da especificidade de anticorpos anti-NLP-CSP _{CT} e anti-SP _R	53
	prot	teína	Soroprevalência dos anticorpos específicos contra o vírus da caxumba a NP em residentes de áreas endêmicas e não-endêmicas para 5	
	4.4. CSI		Detecção de células secretoras de anticorpos específicas para NLP- no baço e medula óssea de camundongos imunizados	57
	4.4.		Avaliação da eficácia da vacina	
5.	DIS	CUS	SSÃO	
6.			USÕES	

7 .	REFERÊNCIAS	73
8.	ANEXOS	89

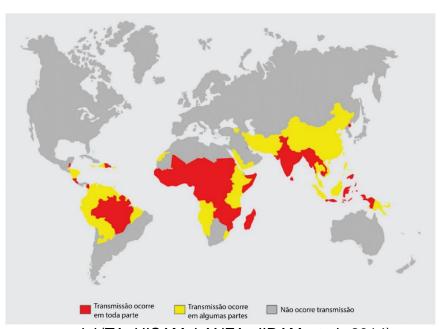
1.INTRODUÇÃO

1.1. Malária no Brasil e no Mundo

A malária é um grave problema de saúde pública e indiscutivelmente a doença parasitária tropical mais devastadora do mundo. Estima-se que 3,3 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco (WHO, 2019).

Em 2019 mais de 405 mil pessoas vieram a óbito, destas, 272 mil foram crianças, tonando-se assim, a doença que mais mata crianças com idade inferior a 5 anos (WHO, 2019). A malária corresponde à quinta causa de morte por doença infecciosa no mundo e a segunda na África (CRAWLEY; CHU; MTOVE; NOSTEN, 2010; WHO, 2019). A maioria dos casos desse número alarmante (228 milhões de casos no ano de 2018), concentrase na África Tropical, e os demais se distribuem nas Américas Central e Sul, Sudoeste da Ásia e ilhas da Oceania, como apresentado na figura 1 (MER; DUNSER; GIERA; DONDORP, 2020; WHO, 2019).

Os agentes etiológicos da malária humana são parasitos que pertencem ao filo Apicomplexa, gênero *Plasmodium: Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale* e os mais recentemente classificados como agentes etiológicos humanos, embora ainda sendo considerados como causadores de zoonoses estão: *Plasmodium knowlesi* (KANTELE; JOKIRANTA, 2011), *Plasmodium simium* (BRASIL; ZALIS; DE PINA-COSTA; SIQUEIRA *et al.*, 2017) e



Plasmodium cynomolgi (TA; HISAM; LANZA; JIRAM et al., 2014).

Figura 1. Mapa das regiões de risco para malária no mundo. Adaptado de (MER; DUNSER; GIERA; DONDORP, 2020)

De acordo com o World Malaria Report (WHO, 2019), no ano de 2018 no mundo, foram notificados mais de 7,5 milhões de casos de malária causada por P. vivax, sendo considerada a espécie de maior distribuição geográfica. Nas Américas, a grande maioria dos casos (74,1%) são atribuídos a malária vivax, sendo este, o parasita de maior predominância no continente, em comparação aos demais. O Brasil foi responsável por aproximadamente 23% dos casos (aproximadamente 155 mil), ficando apenas abaixo da Venezuela, responsável por 51% dos casos (WHO, 2019). Hoje, no Brasil, o *P. vivax* é a principal espécie causadora de malária (Figura 2), contribuindo com aproximadamente 85% dos casos registrados no país (SVS-MS, 2020). A infecção atinge principalmente as populações da bacia Amazônica e viajantes (OLIVEIRA-FERREIRA; LACERDA; BRASIL; LADISLAU et al., 2010). Apesar da grande maioria dos casos de malária ocorridos anualmente no Brasil (cerca de 99%) serem localizados na região da Amazônia, outras áreas do país possuem condições favoráveis para a disseminação e prevalência da doença, como por exemplo, a presença do mosquito vetor, turistas infectados transitando, entre outras (MARINHO; SALLUM; ROSA-FREITAS; LOURENCO-DE-OLIVEIRA et al., 2018).

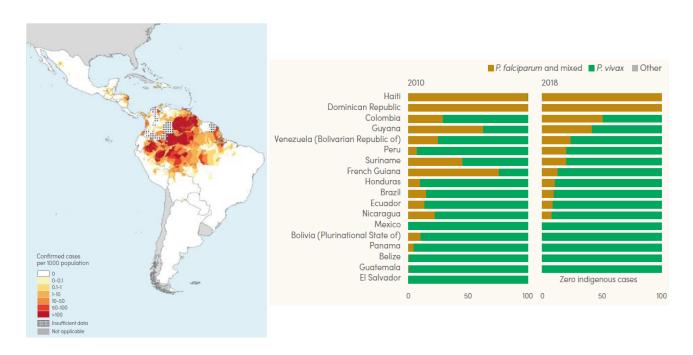


Figura 2. Distribuição da malária na América do Sul. Adaptado de: WHO, 2019

1.2. Ciclo do parasito

Como mencionado acima, a malária humana pode ser causada por 7 diferentes agentes etiológicos. Durante o repasto sanguíneo ocorre a inoculação do parasito na derme, sob a forma de esporozoítos, pelo mosquito fêmea do gênero Anopheles sp. Os esporozoítos são formas móveis do parasito cuja motilidade, que está relacionada à reorientação de proteínas em sua superfície, é necessária para invasão dos capilares dérmicos, ganhando a corrente sanguínea até atingir as células hepáticas (MENARD, 2001). Embora não havendo evidencias em humanos, estudos em modelos murinos utilizando esporozoítos de Plasmodium berghei e Plasmodium yoelii mostram que os mesmos podem realizar esquizogonia exoeritrocítica completa, não apenas dentro dos hepatócitos, mas também dentro das células da pele. No entanto, embora os merozoítos infecciosos de *P. berghei* liberados possam ocasionalmente invadir eritrócitos no camundongo, os merozoítos derivados da pele não contribuem significativamente para a infecção eritrocitária em condições normais. (GUEIRARD; TAVARES; THIBERGE; BERNEX et al., 2010). Cerca de 30% dos esporozoítos têm sucesso no processo de invasão (AMINO; THIBERGE; MARTIN; CELLI et al., 2006; KRETTLI; DANTAS, 2000), já os demais (70%), são capturados por fagócitos residentes nos tecidos, células apresentadoras de antígenos ou alvos de mastócitos, linfócitos T, células linfóides inatas e anticorpos (DAILY, 2018).

Ao chegar no fígado, após o reconhecimento de receptores de superfície, os esporozoítos infectam os hepatócitos (SIDJANSKI; VANDERBERG, 1997). O mecanismo exato envolvido no tráfego dos esporozoítos até alcançarem os hepatócitos ainda é impreciso, todavia sabe-se que a passagem dos parasitos por várias destas células antes da invasão parece ser essencial para o ciclo de vida do parasito (COPPI; TEWARI; BISHOP; BENNETT et al., 2007; GUEIRARD; TAVARES; THIBERGE; BERNEX et al., 2010; SILVIE; FRANETICH; BOUCHEIX; RUBINSTEIN et al., 2007). Uma vez no interior dos hepatócitos, ocorre a diferenciação dos esporozoítos em trofozoítos, que se multiplicam por esquizogonia, originando esquizontes teciduais (SHORTT; GARNHAM, 1948; TARUN; BAER; DUMPIT; GRAY et al., 2006). Esta fase do ciclo é denominada pré-eritrocítica ou tecidual. Nesta fase, existe uma particularidade nos ciclos de vida do *P. vivax* e *P. ovale*, que é a formação de formas latentes (hipnozoítos), capazes de permanecer no interior dos hepatócitos por longos períodos de tempo e ocasionar 1 ou mais recaídas da doença, meses após o contágio (COGSWELL, 1992).

Os merozoítos são liberados em vesículas denominadas merossomos que transportam centenas de merozoítos para a corrente sanguínea e ao mesmo tempo são capazes de protegê-los do ataque das células de Kuppfer do fígado (STURM; AMINO; VAN DE SAND; REGEN et al., 2006). Após evasão dos hepatócitos, tem início a fase eritrocítica de vida do parasito, que é marcada pela invasão das hemácias pelos merozoítos. Este estágio do ciclo de *P. vivax* se diferencia do *P. falciparum*, uma vez que este invade tanto as células maduras como as jovens, já o *P. vivax* infecta restritamente as hemácias jovens, chamadas de reticulócitos. Muito provavelmente estas diferenças, apesar de não elucidadas completamente, estão relacionadas a interações de ligantes-receptores (MOON; SHARAF; HASTINGS; HO et al., 2016).

No interior dos eritrócitos o parasito se multiplica, também por esquizogonia, acarretando na formação de novos merozoítos, que por sua vez irão causar a lise da célula hospedeira e posteriormente irão invadir novas células sanguíneas, processo esse que se repete ininterruptamente. É durante esta etapa do ciclo que ocorre o aparecimento dos sintomas. Dentre todos, o mais clássico é o paroxismo febril, que são marcados por períodos de frio, calor e suor. Outros sintomas são: o aumento de temperatura corporal, seguidos por calafrios, cefaleia, náuseas e vômitos, fraqueza e cansaço constantes, e icterícia em alguns casos (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018).

Ocasionalmente, alguns trofozoítos diferenciam-se em gametócitos (feminino e masculino) que é o estágio sexuado do parasito, onde nesta etapa, necessitam de um hospedeiro invertebrado para darem sequência ao seu desenvolvimento, uma vez que estes não sofrem divisão. Quando um mosquito *Anopheles sp* se alimenta do sangue de indivíduos infectados, no intestino, irá ocorrer a fecundação de gametócitos (macrogameta e microgameta) evoluindo para a forma de zigoto, em seguida oocineto e oocisto, para que ao final do processo, sejam originados os esporozoítos, estes permanecem armazenados nas glândulas salivares do vetor até sua próxima hematofagia, momento no qual estas formas do parasito são transferidas para a derme de um novo hospedeiro vertebrado, infectando-o (SIMONETTI, 1996).

No passado, a malária era conhecida como febre terçã ou quartã, dependendo da espécie do parasito. Isso se referia à forma em que a febre se apresentava nos pacientes depois de aproximadamente 15 dias da infecção inicial: no caso da terçã, a febre acontecia a cada 48 horas (*P. vivax*, *P. falciparum* e *P. ovale*), já a quartã, a cada 72

horas (P. malariae). Ainda sobre a febre terçã, casos de malária causados por P. vivax eram chamados de febre terçã "benigna" enquanto que para P. falciparum era atribuído o nome de febre terçã "maligna" (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018). Todavia, com o aprofundamento dos estudos da fisiopatologia da doença, este tipo de nomenclatura entrou em desuso, isto porque evidenciou-se que a malária vivax também pode causar complicações aos indivíduos acometidos por ela (COELHO; LOPES; PIMENTEL; NOGUEIRA et al., 2013). As principais complicações da malária vivax são a anemia e a trombocitopenia, associados a outros distúrbios hematológicos. A primeira é resultado da remoção de glóbulos vermelhos não infectados, um mecanismo particularmente importante na malária vivax aguda, já que os glóbulos vermelhos infectados com P. vivax são minimamente aderentes (DOUGLAS; ANSTEY; BUFFET; POESPOPRODJO et al., 2012). Já a segunda, é resultado da combinação de distúrbios na coagulação, da esplenomegalia, e de alterações na medula óssea (COELHO; LOPES; PIMENTEL; NOGUEIRA et al., 2013), que tornam as plaquetas mais susceptíveis à ação de macrófagos. Estes fatores mostram que a malária vivax não só não deve ser mais descrita como benigna, como não deve mais ser negligenciada (PHILLIPS; BURROWS; MANYANDO; VAN HUIJSDUIJNEN et al., 2017).

A figura 3 resume o ciclo do *P. vivax* tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado.

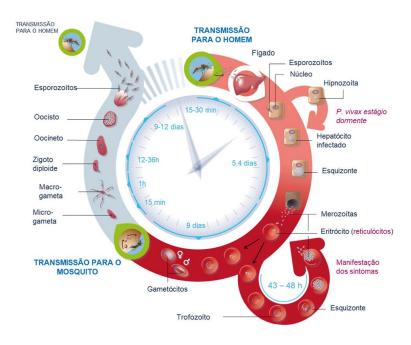


Figura 3. Ciclo do *Plasmodium* spp. O ciclo destaca a fase latente do *P. vivax* e a invasão exclusivamente realizada em reticulócitos. Adaptado de *Medicines for Malaria Venture*. Disponível

em: https://www.mmv.org/newsroom/press-releases/one-step-closer-blocking-transmission-malaria. Acesso em 01 de maio de 2020.

1.3. Medidas de controle e prevenção

Levando em conta a complexidade do ciclo do parasito e o expressivo número de casos reportados anualmente em todo o mundo, é de extrema importância o desenvolvimento de estratégia eficazes no diagnóstico, controle e prevenção da doença (GACHELIN; GARNER; FERRONI; VERHAVE *et al.*, 2018).

As principais vias de controle da doença, baseiam-se em três frentes: I) diagnóstico precoce, II) tratamento da doença após manifestação dos sintomas e III) prevenção.

Dentre as estratégias de diagnóstico, o exame microscópico do sangue é considerado o padrão ouro, podendo ser feito através de esfregaço delgado ou gota espessa. Apesar de ainda ser a técnica mais confiável para diagnosticar a malária, é trabalhosa, contando com técnicos altamente treinados e usando microscópios para analisar as amostras. Como limitação desta técnica, podemos destacar o tempo levado para realizar a técnica, variabilidade na qualidade da leitura (definição de carga parasitária e diferenciação de espécies), dificuldade de utilização em ambientes com poucos recursos e a impossibilidade de detecção de resistência a medicamentos (GARCIA, 2010; TANGPUKDEE; DUANGDEE; WILAIRATANA; KRUDSOOD, 2009).

Infecções assintomáticas ou sub-microscópicas (ou seja, de baixa detecção pelo método de esfregaço sanguíneo ou gota espessa) são muito comuns, além de que, a maioria, senão todas essas infecções, produz gametócitos e provavelmente contribuem substancialmente para manter a transmissão por *P. vivax* (MUELLER; SHAKRI; CHITNIS, 2015).

Como mencionado anteriormente, é muito comum que pacientes infectados apresentem recaídas das doença, sendo estas atribuídas a presença dos hipnozoítos e que podem contribuir com até 80% de todas as infecções no estágio sanguíneo e, se não for tratado adequadamente, pode causar novas infecções, meses e até mesmo anos após a infecção primária (BETUELA; ROSANAS-URGELL; KINIBORO; STANISIC *et al.*, 2012; WHITE, 2011). Além de que, como não existem testes de diagnóstico que possam detectar a presença de hipnozoítos, portadores indetectáveis são uma importante e potencial fonte de reintrodução de *P. vivax* (BETUELA; ROSANAS-URGELL; KINIBORO; STANISIC *et al.*, 2012; WHITE,

2011). Outro fator ligado a presença de hipnozoítos, é que com as recaídas, torna-se também difícil a erradicação da doença, uma vez que o indivíduo se torna um reservatório do parasita permitindo a reintrodução em áreas susceptíveis (WELLS; BURROWS; BAIRD, 2010).

Portanto, uma alternativa para se realizar o diagnóstico em locais com poucos recursos, é o teste rápido para detecção de antígenos do parasito. Estes, todavia, não podem ser usados para controle de cura, devido à possível persistência de partes do parasito (MOODY, 2002). Técnicas alternativas como a reação da polimerase em cadeia ou PCR (do inglês "*Polymerase Chain Reaction*"), apesar de apresentarem alta sensibilidade na diferenciação das espécies, são caras, pois exigem equipamentos e reagentes específicos (BERZOSA; DE LUCIO; ROMAY-BARJA; HERRADOR *et al.*, 2018). Sendo assim, novos e aprimorados testes de diagnósticos são essenciais para o controle eficaz da malária, bem como para a identificação de resistência a medicamentos (MOODY, 2002).

No que tange aos tratamentos, são administrados quimioterápicos antimaláricos por um período que varia de 3 a 14 dias. Os antimaláricos visam interromper principalmente a esquizogonia sanguínea, responsável tanto pela patogenia quanto pelas manifestações clínicas da malária. Particularmente para *P. vivax*, o tratamento também tem como objetivo impedir as recaídas associadas aos hipnozoítos (TSE; KORSIK; TODD, 2019). Existirem também antimaláricos com atividade gametocítica, ou seja, que agem sobre os gametócitos gerados na fase sanguínea (TSE; KORSIK; TODD, 2019).

Um fator complicador a ser considerado no tratamento *P. vivax*, é a necessidade da utilização do fármaco primaquina, que visa a destruição da forma latente do parasito. Entretanto, parte da população possui deficiência na produção de uma enzima hepática chamada de G6PD (Glucose-6-fosfato dehidrogenase), sendo impossibilitada de utilizar este fármaco (HILL; BAIRD; PARISE; LEWIS *et al.*, 2006; PETERS; VAN NOORDEN, 2009). Alternativamente, a utilização do fármaco tafenoquina vem sendo revolucionária, já que com uma única dose, é capaz de eliminar o parasito e prevenir recaídas. Assim, torna-se uma alternativa ao tratamento padrão com primaquina, que possui tempo de tratamento mais longo, uma vez que a falta de adesão do paciente é uma das causas de recaída da doença. Apesar da clara vantagem deste novo fármaco, o mesmo também é restrito a indivíduos que

possuem deficiência de G6PD (LLANOS-CUENTAS; LACERDA; HIEN; VELEZ et al., 2019).

No que se refere a terapias profiláticas, medicamentos como a mefloquina e a atovaquona-proguanil, são indicados tanto para mulheres em gestação quanto para viajantes que irão para áreas endêmicas, todavia estes medicamentos possuem altos custos e a aderência ao tratamento vai decaindo ao longo do tempo (GONZALEZ; PONS-DURAN; PIQUERAS; APONTE *et al.*, 2018; MELTZER; RAHAV; SCHWARTZ, 2018; TICKELL-PAINTER; MAAYAN; SAUNDERS; PACE *et al.*, 2017).

Vale destacar que há diversos relatos sobre o aumento da resistência aos principais fármacos utilizados no tratamento da malária, tanto para malária falciparum quanto malária vivax (PEPLOW, 2016). Fato este que contribui de maneira relevante para a reemergência de casos em locais considerados erradicados ou controlados (ANTHONY; BURROWS; DUPARC; MOEHRLE et al., 2012; PHILLIPS; LOTHARIUS; MARSH; WHITE et al., 2015; ROCAMORA; ZHU; DONDORP et al., 2018; SIRAWARAPORN: LIONG: SATHITKUL: SIRAWARAPORN; YUTHAVONG et al., 1997). Estes fatores estimulam ainda mais a busca de novos fármacos, como, por exemplo, a marinoquinolina, que vem se destacando em testes preliminares in vitro e modelos animais, contra P. faciparum, por conseguir eliminar cepas resistentes aos fármacos mais convencionalmente utilizados (AGUIAR; PANCIERA; SIMAO DOS SANTOS; SINGH et al., 2018).

No que tange as estratégias de prevenção, podemos destacar o controle do vetor transmissor. As principais ações de combate ao vetor, adotadas em pequena e média escala, são através de instalação de telas de proteção nas residências, mosquiteiros impregnados com inseticidas e a pulverização de inseticidas. Estas estratégias impactam significativamente na diminuição da transmissão (SNOW et al., 1999; FOSTER; PHILLIPS, 1997). Como em qualquer estratégia utilizada, também existem desvantagens, e a principal é o crescente número de relatos de resistência dos mosquitos aos inseticidas utilizados (BUTLER, 2011; DIJANIC; NICKERSON; SHAKYA; DIJANIC et al., 2018).

Uma estratégia que vem ganhando notoriedade é o emprego de mosquitos machos geneticamente modificados, que ao se acasalarem com as fêmeas, impedem a produção do cromossomo X e a consequente reprodução de novos

mosquitos fêmeas (GALIZI; DOYLE; MENICHELLI; BERNARDINI *et al.*, 2014). Entretanto, o impacto desconhecido da inserção de animais geneticamente modificados no meio ambiente é uma questão ainda em discussão (BILGO; LOVETT; FANG; BENDE *et al.*, 2017).

Dentre todas as estratégias de prevenção, a que possui melhor custobenefício, podendo também ser a de melhor eficácia, é a vacinação, uma vez que ajudaria não somente a driblar a questão de adesão e toxicidade dos fármacos utilizados no tratamento, como também o aumento da resistência dos vetores aos inseticidas (GREENWOOD, 2005; MAL, 2011).

1.4. Considerações sobre as estratégias de desenvolvimento de vacinas contra Malária

A vacinação, até o presente momento, é um dos métodos que possui maior impacto para redução da morbidade/mortalidade e aumento da qualidade de vida para seres humanos (POLAND; OVSYANNIKOVA; KENNEDY, 2018).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra a malária são altamente complexos, com diversas lacunas e com alta variabilidade da resposta no homem, além da grande diversidade de antígenos do parasito. Porém, ao longo dos anos, diversos trabalhos sugerem que a indução de uma imunidade protetora contra a malária é um objetivo palpável (COELHO; DORITCHAMOU; ZAIDI; DUFFY, 2017). Contribuem para essa hipótese o desenvolvimento de proteção através da inoculação de esporozoítos irradiados em camundongos (NUSSENZWEIG: VANDERBERG; MOST; ORTON, 1967), em primatas não humanos (COLLINS; NUSSENZWEIG; BALLOU; RUEBUSH et al., 1989) e em humanos (CLYDE, 1990; EPSTEIN; TEWARI; LYKE; SIM et al., 2011; RIECKMANN; BEAUDOIN; CASSELLS; SELL, 1979); já o desenvolvimento de uma imunidade naturalmente adquirida é altamente variável, onde pode ser necessário múltiplas e/ou contínuas exposições ao parasito, sendo que esta proteção é cepa-específica, que pode ser de longa ou curta duração, (DOOLAN; DOBANO; BAIRD, 2009; MUELLER; GALINSKI; TSUBOI; AREVALO-HERRERA et al., 2013); também foi constatado proteção de indivíduos através de transferência passiva de anticorpos de pessoas consideradas imunes para indivíduos não imunes (SABCHAREON; BURNOUF; OUATTARA; ATTANATH et al., 1991).

Umas das questões mais relevantes, se não a mais, no desenvolvimento de uma vacina com potencial esterilizante, é a escolha do(s) melhor(es) antígeno(s). A problemática se dá devido ao ciclo do parasito ser bastante complexo, sendo dividido em basicamente 3 fases, como descrito no item acima, onde, durante cada etapa do ciclo, são expressos inúmeros genes diferentes, que são traduzidos em diversas proteínas, onde parte destas pode possuir potencial como antígeno vacinal (HERRERA; CORRADIN; AREVALO-HERRERA, 2007).

Com base nestas afirmativas, infere-se que o reconhecimento de um único imunógeno possa ser insuficiente para a obtenção de uma vacina eficaz, fato que estimula a obtenção de formulações compostas por múltiplos antígenos provenientes de múltiplos estágios, potencializando a reposta imune contra o parasito, gerando uma gama maior de anticorpos, células efetoras e citocinas (FERRARO; TALBOTT; BALAKRISHNAN; CISPER *et al.*, 2013; GOOD; DOOLAN, 2010).

1.5. Utilização da Proteína Circumsporozoíta como antígeno vacinal.

A Proteína Circumsporozoíta (CSP, do inglês Circumsporozoite Protein) recobre a superfície dos esporozoítos, sendo requerida para o processo de invasão das células hepáticas do hospedeiro (MCCUTCHAN; KISSINGER; TOURAY; ROGERS et al., 1996; STEWART; NAWROT; SCHULMAN; VANDERBERG, 1986). Os genes de CSP estão bem caracterizados e a análise de sua estrutura primária nas espécies de *Plasmodium* identificam 3 regiões claramente definidas: uma extensa região central de aminoácidos em tandem (repeats) espécies-específicos que ocupa mais de 1/3 da molécula (ARNOT; BARNWELL; STEWART, 1988; ARNOT; BARNWELL; TAM; NUSSENZWEIG et al., 1985; HERRINGTON; CLYDE; LOSONSKY; CORTESIA et al., 1987), flanqueada por 2 regiões altamente conservadas, região I, N-terminal que se liga a proteoglicanos (ALEY; BATES; TAM; HOLLINGDALE, 1986; CERAMI; FREVERT; SINNIS; TAKACS et al., 1992; DAME; WILLIAMS; MCCUTCHAN; WEBER et al., 1984) e região II, C-terminal, com domínio de adesão celular TSR (trombospondina). A região C-terminal possui 2 pares de cisteínas conservadas (DAME; WILLIAMS; MCCUTCHAN; WEBER et al., 1984) que estão relacionados a conformação da proteína e reconhecimento do receptor da superfície dos hepatócitos expostos ao fluxo sanguíneo (Figura 4)(CERAMI; FREVERT; SINNIS; TAKACS et al., 1992; DAME; WILLIAMS; MCCUTCHAN; WEBER et al., 1984;

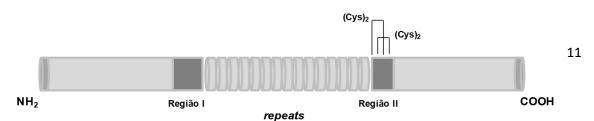


Figura 4. Representação esquemática da Proteína CS de *Plasmodium*. Adaptado de: (NARDIN; NUSSENZWEIG, 1993)

Ao longo dos estudos envolvendo isolados de *P. vivax*, descobriu-se a existência de variações alélicas para a região central da proteína CS. As sequências de aminoácidos GDRA[A/D]GQPA, caracterizam o genótipo VK210 (ARNOT; BARNWELL; TAM; NUSSENZWEIG *et al.*, 1985), a sequência ANGA[G/D][N/D]QPG caracterizam o genótipo VK247 (ROSENBERG; WIRTZ; LANAR; SATTABONGKOT *et al.*, 1989), sendo estes alelos mais frequentes em comparação ao terceiro genótipo, chamado de *P. vivax-like* (APGANQ[E/G]GGAA), que apesar de controvérsias, a maioria dos autores o reconhecem como uma terceira variante alélica do *P. vivax* (QARI; SHI; GOLDMAN; UDHAYAKUMAR *et al.*, 1993). Vale destacar que estas variantes alélicas não apresentam reconhecimento cruzado por anticorpos policlonais (QARI; GOLDMAN; POVOA; OLIVEIRA *et al.*, 1991). Além disso, todas as 3 variantes identificadas possuem distribuição mundial (KAIN; WIRTZ; FERNANDEZ; FRANKE *et al.*, 1992; OLIVEIRA-FERREIRA; PRATT-RICCIO; ARRUDA; SANTOS *et al.*, 2004; QARI; GOLDMAN; POVOA; OLIVEIRA *et al.*, 1991; STORTI-MELO; DE SOUZA-NEIRAS; CASSIANO; JOAZEIRO *et al.*, 2009).

No Brasil, alguns estudos foram realizados com o intuito de avaliar a incidência das variantes bem como a prevalência de anticorpos contra a proteína CS. Foi constatado através de PCR a presença de todas as variantes alélicas em áreas endêmicas da Amazônia Legal (MACHADO; DE FIGUEREIDO FILHO; CALVOSA; FIGUEREDO *et al.*, 2003; MACHADO; POVOA, 2000; STORTI-MELO; DE SOUZA-NEIRAS; CASSIANO; JOAZEIRO *et al.*, 2009), e por sorologia no Pará, em Rondônia, Mato Grosso e em regiões não endêmicas como São Paulo (ARRUDA; ZIMMERMAN; SOUZA; OLIVEIRA-FERREIRA, 2007; CURADO; DUARTE; LAL; OLIVEIRA *et al.*, 1997). Nos estados mencionados, verificou-se uma maior prevalência da variante VK210 (reconhecimento de cerca de 65 a 80%) em comparação das outras 2, que apresentaram distribuição semelhante entre si (ARRUDA; ZIMMERMAN; SOUZA; OLIVEIRA-FERREIRA, 2007; SOARES; LOPEZ-CAMACHO; RODRIGUES-DA-SILVA; DA SILVA MATOS *et al.*, 2020).

O emprego da proteína CS como antígeno vacinal foi proposto em 1967, por Nussenzweig e colaboradores, que, após realizarem a imunização de camundongos utilizando esporozoítos de P. berghei irradiados, observaram a proteção estéril destes após desafio, assim, tornando-se "padrão ouro" de estratégia para o desenvolvimento de vacina contra malária. Os anticorpos induzidos por esporozoítos irradiados foram predominantemente direcionados contra a proteína CS, apesar de os esporozoítos permanecerem na circulação sanguínea durante um curto espaço de tempo (NUSSENZWEIG; VANDERBERG; MOST; ORTON, 1967). Estudos realizados mais recentemente por Aliprandini e colaboradores (2018), demonstram que anticorpos monoclonais direcionados às regiões centrais da proteína CS de P. yoelii, possuem não somente a capacidade de diminuição da motilidade do esporozoíto, que impediria a infecção dos hepatócitos, bem como atividade "citotóxica", pois os anticorpos têm a capacidade de "desencapar" o esporozoíto, removendo completamente a proteína CS e fazendo com que o parasito seja destruído. Esta evidência reforça ainda mais a importância da proteína CS como antígeno vacinal (ALIPRANDINI; TAVARES; PANATIERI; THIBERGE et al., 2018). Embora haja evidências de que vacinas baseadas no antígeno CSP podem ser bem sucedidas, o polimorfismo da região central da proteína CS de P. vivax deve ser levado em consideração no momento de se desenvolver uma formulação vacinal, com o objetivo de se ter uma formulação de ampla cobertura (REYES-SANDOVAL; BACHMANN, 2013).

No que diz respeito a indução de uma resposta imune adequada por formulações vacinais contra esse antígeno, é importante conhecer as células que compõe a resposta imune contra a infecção natural nesta etapa do ciclo do *P. vivax*. Durante o processo de invasão dos hepatócitos pelos esporozoítos, fragmentos dos antígenos são apresentados na superfície da célula hepática, os quais podem ser reconhecidos por células T-citotóxicas (TCD3+CD8+) (DOOLAN; MARTINEZ-ALIER, 2006). As células *Natural Killer* (NK) e T auxiliares (TCD3+CD4+) são induzidas a ativação por IL-12 (interleucina 12), que é produzida pelo contato de macrófagos, células dendríticas e células de Kupffer com a CSP (ARTAVANIS-TSAKONAS; RILEY, 2002; RILEY; WAHL; PERKINS; SCHOFIELD, 2006). Esses linfócitos possuem papel crítico na destruição direta do hepatócito infectado, já que a secreção de IFN-γ, principal molécula efetora, que deflagra a produção de reativos intermediários do oxigênio pelos hepatócitos, como o óxido nítrico, tóxico para parasitos intracelulares (ARTAVANIS-TSAKONAS;

RILEY, 2002; HOLLINGDALE; NARDIN; THARAVANIJ; SCHWARTZ *et al.*, 1984; RILEY; WAHL; PERKINS; SCHOFIELD, 2006). As células T auxiliares atuam complementarmente, auxiliando na ativação e diferenciação de células B ou de linfócitos T citotóxicos (DOOLAN; MARTINEZ-ALIER, 2006).

Formulações vacinais com foco em antígenos expressos durante a fase préeritrocítica do parasito, tem como principal objetivo, gerar anticorpos capazes de
neutralizar os esporozoítos e consequentemente impedir a invasão dos hepatócitos
(HOLLINGDALE, 1990). Todavia, é de relevante importância a geração de respostas
mediadas por células T citotóxicas e T auxiliares (HAFALLA; SILVIE; MATUSCHEWSKI,
2011; RENIA; GRILLOT; MARUSSIG; CORRADIN et al., 1993; ROMERO; MARYANSKI;
CORRADIN; NUSSENZWEIG et al., 1989), que em combinação com a ação de
anticorpos altamente neutralizantes, atuam em conjunto para impedir a infecção dos
hepatócitos e eliminação destes uma vez que estejam infectados e, assim, bloqueando a
progressão da infecção (HAFALLA; SILVIE; MATUSCHEWSKI, 2011; NARDIN;
NUSSENZWEIG, 1993; SILVIE; AMINO; HAFALLA, 2017) e oferecendo imunidade
estéril (COLLINS; NUSSENZWEIG; BALLOU; RUEBUSH et al., 1989).

1.6. Adjuvantes em vacinas

Os adjuvantes vêm sendo utilizados por décadas para aumentar a resposta imune de antígenos em vacinas (DI PASQUALE; PREISS; TAVARES DA SILVA; GARCON, 2015). A incorporação de adjuvantes em formulações vacinais tem basicamente a função de acelerar e prolongar uma resposta imune especifica. Sendo assim, suas principais vantagens são o aprimoramento da imunogenicidade de antígenos "fracos", redução da quantidade de antígeno requerido para uma boa imunização e redução da frequência dos reforços necessária para manter o indivíduo protegido contra determinada patologia (AUCOUTURIER; ASCARATEIL; DUPUIS, 2006; DI PASQUALE; PREISS; TAVARES DA SILVA; GARCON, 2015; DIDIERLAURENT; LAUPEZE; DI PASQUALE; HERGLI *et al.*, 2017).

De modo geral, os adjuvantes podem ser classificados com base em sua fonte, mecanismo de ação e propriedades físico-químicas. As classes mais comumente descritas na literatura são: sais de minerais, partículas lipídicas, micropartículas e imuno potenciadores (DI PASQUALE; PREISS; TAVARES DA SILVA; GARCON, 2015). Todavia, muitos adjuvantes, independentemente da sua classificação, nunca foram liberados para uso humano devido a critérios de aceitação em relação a segurança de sua utilização (APOSTOLICO JDE; LUNARDELLI; COIRADA; BOSCARDIN *et al.*, 2016). A figura abaixo mostra os adjuvantes que atualmente estão licenciados para a utilização em humanos e os que estão em processos de avaliação (APOSTOLICO JDE; LUNARDELLI; COIRADA; BOSCARDIN *et al.*, 2016).

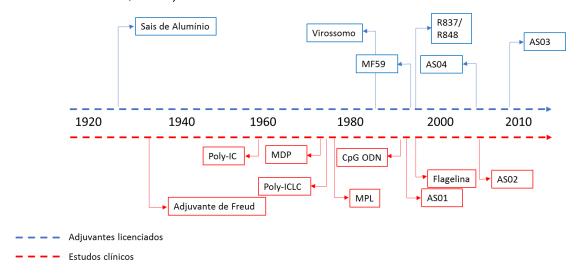


Figura 5. Linha do tempo dos principais adjuvantes em estudo. Adaptado de: (APOSTOLICO JDE; LUNARDELLI; COIRADA; BOSCARDIN *et al.*, 2016)

Destacando a importância dos adjuvantes na modulação da resposta imune, no desenvolvimento deste trabalho, após estudos prévios, realizamos a seleção de dois adjuvantes para compor as formulações vacinais, são eles:

Montanide ISA 720

O Montanide® ISA 720 é um adjuvante experimental, formulado como emulsões água-em-óleo, que induz títulos de anticorpos elevados em várias espécies animais. Em sua composição possui um esqualeno, em fase experimental, que contém como emulsionante o mono-oleato de mannida. Este adjuvante forma gotas de água-óleo estáveis destinadas a proporcionar uma libertação lenta do

antígeno no local da injeção, onde, por efeito de depósito, os antígenos são liberados lentamente e permanecem por períodos maiores de tempo no organismo (AUCOUTURIER; ASCARATEIL; DUPUIS, 2006; MILES; MCCLELLAN; RAUSCH; ZHU *et al.*, 2005; ROESTENBERG; REMARQUE; DE JONGE; HERMSEN *et al.*, 2008)

Poly (I:C)

O Poly-IC polyinosinic:polycytidylic acid, é uma dupla fita de RNA sintética que atua como agonista de receptores TLR-3 (*toll like receptor 3*), receptor este encontrado no endossomo das células e que induz a produção de interferon do tipo I (IFN), citocinas/quimiocinas inflamatórias e estimulação da maturação de células dendríticas. Há também evidências sobre a indução de resposta mediada por linfócitos TCD8+, através de mediadores inatos, incluindo células NK e macrófagos (MATSUMOTO; SEYA, 2008; SALEM; DIAZ-MONTERO; EL-NAGGAR; CHEN *et al.*, 2009; SALEM; EL-NAGGAR; KADIMA; GILLANDERS *et al.*, 2006; SCHNEIDER-OHRUM; GILES; WEIRBACK; WILLIAMS *et al.*, 2011). O Poly-ICLC possuiu as mesmas propriedade biológicas que o Poly (I:C), todavia com a finalidade de melhorar sua estabilidade, em sua estrutura foi adicionada uma cauda de poli-lisina e a solução veículo foi acrescida de caboximetilcelulose (APOSTOLICO JDE; LUNARDELLI; COIRADA; BOSCARDIN *et al.*, 2016).

1.7. Estudos clínicos envolvendo vacinas contra malária

Os informes mais recentes relatam que outras 7 passam por testes clínicos de fase I e II e 3 em estudos pré-clínicos (COELHO; DORITCHAMOU; ZAIDI; DUFFY, 2017). Mais de 60% dos candidatos vacinais explorados nas últimas décadas baseiam-se em 3 antígenos descobertos há mais de 20 anos, conforme demonstrado na figura 6, a CSP, a Proteína 1 de Superfície de Merozoíto (MSP-1, do inglês *Merozoite Surface Protein* 1) e o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1, do inglês *Apical Membrane Antigen* (TUJU; KAMUYU; MURUNGI; OSIER, 2017).

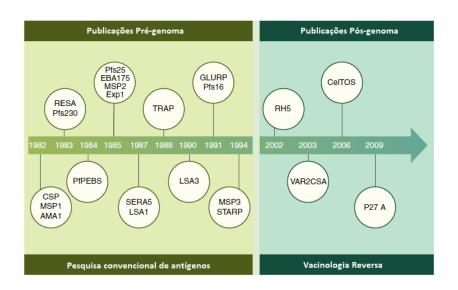


Figura 6. Pesquisa de novos antígenos para o desenvolvimento de vacinas contra malária. Adaptado de: (TUJU; KAMUYU; MURUNGI; OSIER, 2017).

Baseado em achados da década de 60 descrito por Nussenzweig e colaboradores (1967), a empresa norte-americana Sanaria, desenvolveu uma vacina contra P. falciparum baseado em esporozoítos inteiros atenuados (HOFFMAN; GOH; LUKE; SCHNEIDER et al., 2002). Na versão mais recente das formulações em desenvolvimento, os mosquitos são mantidos em laboratório, onde há o processo de infecção dos mesmos e, posteriormente, as glândulas salivares de cada mosquito são retiradas para a coleta dos parasitos e inativados por irradiação (HOFFMAN; GOH; LUKE; SCHNEIDER et al., 2002; MORDMULLER; SUPAN; SIM; GOMEZ-PEREZ et al., 2015; NUSSENZWEIG; VANDERBERG; MOST; ORTON, 1967). Atualmente este projeto está no início do estudo clinico de fase II, na ilha de Bioko no oeste da África, onde cerca de 2.100 pessoas estão sendo estudadas (BUTLER, 2019). Apesar de ser uma estratégia que pode conferir proteção superior a 60%, e de longa duração (LYKE; ISHIZUKA; BERRY; CHAKRAVARTY et al., 2017) existe uma clara desvantagem: a manutenção de insetários e a coleta manual das glândulas salivares. A combinação desses dois fatores implica em uma significativa lentidão na questão logística de fornecimento de doses, já que milhões de pessoas necessitariam dessa vacina e sua obtenção é cara e trabalhosa (EPSTEIN; RICHIE, 2013; HOFFMAN; BILLINGSLEY; JAMES; RICHMAN et al., 2010).

Atualmente apenas uma vacina, chamada RTS,S, recebeu parecer positivo pela EMA (*European Medicines Agency*), ou seja, que apresentou segurança e eficácia nos testes clínicos. Esta vacina, que foi desenvolvida pela GSK em parceria com a *Walter*

Reed Army Institute (WRAIR), é uma vacina de subunidades expressa em leveduras Saccharomyces cerevisiae, especificamente direcionada para o P. falciparum (DI PASQUALE; PREISS; TAVARES DA SILVA; GARCON, 2015). O antígeno de superfície (S) da Hepatite B é utilizado como matriz para a porção C-terminal e os repeats de PfCSP. O antígeno de superfície do vírus da hepatite B possui a capacidade de formação de uma estrutura chamada de VLP (do inglês, Virus Like Particle) - esta estratégia será melhor detalhada no tópico seguinte. Este antígeno vacinal é administrado juntamente com o sistema de adjuvantes AS01 (AS – do inglês adjuvant system) fornecidos pela GSK (CAMPO; SACARLAL; APONTE; AIDE et al., 2014; GARCON; HEPPNER; COHEN, 2003; RTS, 2014; WHITE; BEJON; OLOTU; GRIFFIN et al., 2013; WHITE; VERITY; GRIFFIN; ASANTE et al., 2015).

Durante os ensaios clínicos de fase IIa com indivíduos voluntários de áreas não endêmicas desafiados com picadas de mosquitos infectados com *P. falciparum*, foi possível constatar um taxa de proteção que variou de 32 a 50% (KESTER; MCKINNEY; TORNIEPORTH; OCKENHOUSE *et al.*, 2007). Investigações sobre a correlação entre a vacinação e a resposta protetora indicam uma alta correlação com os elevados títulos de anticorpos IgG circulantes contra os *repeats* da região central da CSP (WHITE; BEJON; OLOTU; GRIFFIN *et al.*, 2013). Já em ensaios de fase III com crianças africanas, que viviam em áreas endêmicas, a formulação vacinal RTS,S em combinação com o adjuvante AS01 (composto pelos imunoestimulantes monofosforil lipídio A (MPL) e saponina QS21 purificada de *Quillaja saponaria*) demonstrou uma eficácia de 49,5%, entre aquelas na faixa etária de 5-17 meses de idade, e de 30,1%, entre aquelas na faixa etária de 6-12 semanas de idade (RTS; AGNANDJI; LELL; FERNANDES *et al.*, 2012; VANDOOLAEGHE; SCHUERMAN, 2016). Atualmente a RTS,S encontra-se em um projeto piloto de implementação em 3 países da África (ADEPOJU, 2019).

Em relação ao desenvolvimento de vacina contra *P. vivax*, a formulação em estágio mais avançado de testes é a VMP001, onde a mesma foi finalizada após a conclusão do estudo clínico de fase I/IIa (BENNETT; YADAVA; TOSH; SATTABONGKOT *et al.*, 2016). Esta formulação também foi desenvolvida pela Glaxo Smith Kline em parceria com a *Walter Reed Army Institute of Research* (BELL; WOOD; BANSAL; RAGAB *et al.*, 2009). Em sua composição são utilizadas proteínas recombinantes que representam as duas variantes da CSP de *P. vivax* mais prevalentes, que são VK210 e VK247 (ambas contendo as regiões N- e C-terminais),

e utiliza a bactéria E. coli como sistema de expressão (YADAVA; SATTABONGKOT; WASHINGTON; WARE et al., 2007). Em estudo preliminares em camundongos a VMP001 foi testada utilizando o Montanide® ISA 720 como adjuvante. Entretanto, apesar de apresentar uma boa resposta em relação aos títulos de anticorpos em ensaios posteriores, а mesma foi substituída pelo adjuvante **AS01** (VANLOUBBEECK; PICHYANGKUL; BAYAT; YONGVANITCHIT et al., 2013; YADAVA; NURMUKHAMBETOVA; PICHUGIN; LUMSDEN, 2012). Até o momento essa formulação mostrou-se uma boa candidata, apesar de não induzir proteção estéril, o tempo de parasitemia teve um atraso de dois dias em 59% os indivíduos vacinados, quando comparado ao grupo controle (BENNETT; YADAVA; TOSH; SATTABONGKOT et al., 2016).

Um dos fatores que contribuem para a dificuldade no desenvolvimento de vacinas contra malara vivax são relacionados a biologia do próprio parasito. O isolamento e identificação de espécies e posteriormente o cultivo do parasito em cultura celular, são os principais desafios in vitro, já que na fase pré-eritrocítica o maior obstáculo é a impossibilidade de avaliar a formação de hipnozoítos em culturas de hepatócitos (NOULIN; BORLON; VAN DEN ABBEELE; D'ALESSANDRO et al., 2013; UDOMSANGPETCH; KANEKO; CHOTIVANICH; SATTABONGKOT, 2008). Já no estágio sanguíneo, o problema se dá uma vez que o parasito infecta apenas reticulócitos, fazendo com que a manutenção das culturas celulares seja bastante complexa e trabalhosa (NOULIN; BORLON; VAN DEN ABBEELE; D'ALESSANDRO et al., 2013). Como o P. vivax não infecta roedores, testes in vivo somente poderiam ser realizados em macacos, ainda assim, para impulsionar o desenvolvimento dos parasitos, estes animais devem ser esplenectomizados, entrando em um embate ético, além de não fornecer dados robustos (BUTCHER, 2005; GALINSKI; BARNWELL, 2008; WYLER; MILLER; SCHMIDT, 1977). Dessa forma, a estratégia que melhor permite estudar potenciais vacinas contra malária vivax, baseia-se na utilização de parasitos transgênicos, que expressam proteínas de P. vivax (OTHMAN; MARIN-MOGOLLON; SALMAN; FRANKE-FAYARD et al., 2017). A utilização do *P. berghei* se mostrou uma estratégia interessante, onde Espinosa e colaboradores (2013), através de técnicas moleculares, fizeram a substituição da proteína CS P. berghei, pela de P. vivax (ESPINOSA; YADAVA; ANGOV; MAURIZIO et al., 2013). Estes parasítos quiméricos vêm sendo aplicados

como uma das alternativas em estudo pré-clínicos de novas vacinas, porém, há uma limitação importante nesta estratégia: a dificuldade em se desenvolver parasitos que expressem múltiplos antígenos em diferentes estágios, tornando as possibilidades de avaliações limitadas (ESPINOSA; YADAVA; ANGOV; MAURIZIO et al., 2013; OTHMAN; MARIN-MOGOLLON; SALMAN; FRANKE-FAYARD et al., 2017).

1.8. Contribuições de nosso grupo para o desenvolvimento de vacina contra a forma pré-eritrocítica de *P. vivax*.

Baseados nas evidências da existência de variantes alélicas da CSP de P. vivax (PvCSP) e dos resultados favoráveis da vacina RTS,S, TEIXEIRA e colaboradores (2014) geraram 3 proteínas recombinantes, representando cada uma das variantes da proteína CS de P. vivax, bem como uma proteína quimérica contendo os 3 alelos fusionados, além de dois adenovírus recombinantes; um adenovírus humano do sorotipo 5 (AdHu5), outro de chimpanzés do sorotipo 68 (AdC68), ambos deficientes de replicação e codificando a proteína CS contendo as regiões N- e C-terminal e as três variantes alélicas. Inicialmente, para a expressão destas proteínas o nosso grupo empregou um sistema bacteriano de expressão (Escherichia coli). Camundongos da linhagem C57BL/6 foram submetidos aos protocolos de imunização prime-boost homólogos ou heterólogos (proteínas e/ou adenovírus) utilizando o Poly (I:C) como adjuvante. Todas as formulações geraram uma elevada resposta de anticorpos e também de longa duração, comparáveis aos obtidos com a combinação dos adjuvantes ACF/AIF (adjuvantes completo e incompleto de Freund). Outro achado, foi que os anticorpos contra a proteína quimérica reconheceram epitopos contra as 3 variantes e foram capazes de reconhecer a proteína nativa do parasito em ensaios de imunofluorescência. Apesar de induzirem altos títulos de anticorpos, não foi identificado resposta específica por células T a nenhuma das 4 construções, tanto por ELISPOT quanto por análise de secreção de citocinas no sobrenadante de cultura (TEIXEIRA; TARARAM; LASARO; CAMACHO et al., 2014).

Posteriormente, nosso grupo realizou as mesmas construções, porém alterando o sistema de expressão, desta vez utilizando a levedura *Pichia pastoris* como microrganismo produtor. Esta plataforma de expressão torna-se mais

vantajosa em relação a utilização de bactérias, pois possuem os seguintes benefícios:

- Maior rendimento: estudos comparativos sugeriram que a expressão em leveduras é aproximadamente 30% superior quando comparado a expressão obtido em bactéria;
- Expressão solúvel: leveduras podem gerar produtos solúveis enquanto que para bactérias, na maior parte dos casos, tendem a formar corpos de inclusão;
- Livre de endotoxina, que é um problema grave no desenvolvimento de vacinas e as técnicas utilizadas para a remoção destas encarecem o processo, podendo torna-lo inviável;
- Modificações pós-traducionais: diversas modificações pós-traducionais, como glicosilação ou fosforilação, podem ser possivelmente introduzidas em proteínas heterólogas (KASTILAN; BOES; SPIEGEL; VOEPEL *et al.*, 2017; MACAULEY-PATRICK; FAZENDA; MCNEIL; HARVEY, 2005; VERMA; BOLETI; GEORGE, 1998; WANG; JIANG; WANG, 2016).

A partir da utilização dessa plataforma, em outro trabalho de nosso grupo, Gimenez e colaboradores (2017) realizaram a comparação da imunogenicidade induzida pela imunização de camundongos C57BL/6 em um protocolo de *prime-boost* homólogo, utilizando as variantes alélicas da proteína PvCS expressas separadamente e administradas na forma de "mix" ou utilizando essas variantes em uma única proteína, de forma fusionada. A essa construção quimérica foi dado o nome de yPvCSP-AllcT, uma vez que, além de conter todas as variantes alélicas, também conservava a região C-terminal. Em ambos os grupos (variantes expressas individualmente ou variantes fusionadas) foi utilizado o Poly (I:C) como adjuvante. Esse experimento concluiu que, uma vez que ambas formulações são capazes de induzir altos títulos de anticorpos, com longa duração e sem diferenças entre elas, a utilização da yPvCSP-AllcT pode ser empregada no lugar das variantes expressas separadamente (GIMENEZ; LIMA; FRANCOSO; DENAPOLI *et al.*, 2017).

Com isso em mente, a formulação contendo a proteína yPvCSP-All_{CT} na presença do Poly (I:C) foi utilizada em um ensaio de desafio, com o objetivo de avaliar seu efeito protetor. Nesse ensaio, esporozoítos transgênicos de *P. berghei* ANKA expressando a variante VK210 de *P. vivax* foram utilizados como modelo experimental em camundongos (ESPINOSA; YADAVA; ANGOV; MAURIZIO *et al.*,

2013). Os resultados obtidos mostraram um efeito protetor estéril para 4/6 camundongos, e mesmo os animais parasitados, tiveram um diminuição na carga parasitaria do fígado de 20 vezes em relação ao grupo controle, comprovando assim que a formulação avaliada possui grande potencial para ser submetida a ensaios pré-clínicos (GIMENEZ; LIMA; FRANCOSO; DENAPOLI *et al.*, 2017).

Mais recentemente, em outro trabalho de nosso grupo, Camargo e colaboradores (2018) deram continuidade a esta estratégia, analisando a imunogenicidade e efeito protetor de duas proteínas recombinantes expressas em P. pastoris: a yPvCSP-AllFL (contendo as regiões repetidas dos diferentes alelos da proteína CS [VK210, VK 247 e P. vivax-like] flanqueadas pelas regiões N- e Cterminal) e a yPvCSP-All_{CT} (também contendo as regiões repetidas porem sendo flanqueada apenas pela região C-terminal, testada anteriormente no trabalho publicado por Gimenez e colaboradores). Entretanto, com o intuito de induzir uma resposta mediada tanto por anticorpos quanto por células T, foram utilizados adenovírus recombinantes deficiente de replicação (AdHu5 e AdC68) como vetor da proteína PvCSP em um protocolo de prime-boost heterólogo, sendo o prime composto pelos adenovírus recombinantes e o boost com as proteínas yPvCSP-AllFL ou yPvCSP-Allct (DE CAMARGO; DE FREITAS; GIMENEZ; LIMA et al., 2018). Além disso, dessa vez, camundongos C57BL/6 ou BALB/c foram imunizados empregando o Poly (I:C) ou o Montanide ISA 720 como adjuvante. Após desafio desses animais utilizando esporozoítos transgênicos de P. beghei ANKA expressando as variantes VK210 ou VK247 da proteína CS de *P. vivax* foi constatado que, apesar de nenhuma das formulações terem promovido proteção esterilizante, foram obtidos atrasos significativos no aumento da carga parasitária dos grupos imunizados em relação aos grupos controle para todas as formulações testadas. De maneira geral, esses achados demonstram que pode ser possível obter uma vacina que seja capaz de bloquear a infecção pelo parasito (DE CAMARGO; DE FREITAS; GIMENEZ; LIMA et al., 2018).

Seguindo a ordem cronológica das contribuições de nosso grupo no desenvolvimento de uma vacina contra *P. vivax*, a proteína recombinante yPvCSP-AllcT, anteriormente estudada por Gimenez e colaboradores (2017), foi produzida seguindo as normas de BLP (Boas Práticas de Laboratório) por uma empresa especializada na área de biotecnologia. Mais recentemente, no ano de 2019, esta

formulação passou por testes pré-clínicos, recebendo parecer positivo quanto sua toxicidade e segurança, dando um grande passo na confirmação de seu emprego em ensaios clínicos (dados não publicados).

1.9. Utilização de partículas semelhantes a vírus como carreadores de antígenos vacinais.

A maior parte das vacinas licenciadas atualmente ainda são produzidas através de métodos relativamente simples, que tem como objetivo reduzir a virulência. Isto inclui a atenuação do patógeno ou fragmentação e inativação através de substâncias químicas. Todavia, apesar de apresentarem altas taxas de proteção, devido a indução de uma forte resposta mediada por linfócitos B e T, os processos envolvidos na produção destas vacinas também as tornam menos seguras, uma vez que existe a possibilidade de reversão da atenuação ou incompleta inativação destes microrganismos (HAN, 2015; KAECH; WHERRY; AHMED, 2002).

Com o advento da engenharia genética e profundo conhecimento da biologia dos agentes infecciosos, uma nova geração de vacinas vem sendo empregadas utilizando proteínas recombinantes (sendo classificadas também como vacinas de subunidades), produzidas em uma gama enorme de microrganismos, que são utilizados como sistemas de expressão (por exemplo: leveduras, bactérias, células de mamíferos, células de inseto, etc...) e que elevaram consideravelmente o nível de segurança de vacinas, uma vez que não possuem a capacidade de se replicaram e de causarem infecções (MCGHEE; FUJIHASHI; XU-AMANO; JACKSON *et al.*, 1993; OYSTON; ROBINSON, 2012).

As VLPs, vêm sendo amplamente estudadas quanto a sua aplicação no universo da vacinologia. Isso se deve ao fato de que as proteínas recombinantes por si só não estimulam uma potente resposta celular e humoral, sendo necessária várias doses e combinação de potentes adjuvantes para que a resposta desejada seja obtida (FRIETZE; PEABODY; CHACKERIAN, 2016).

Estudos mostram que diversas proteínas virais possuem uma capacidade intrínseca de "automontagem" em VLPs, devido as suas formas icosaédricas (CRISCI; BARCENA; MONTOYA, 2012). Estas possuem a competência de se apresentarem como um vírus inteiro, entretanto, como não possuem material genético, não exercem a habilidade de infectarem as células e se replicarem, sendo assim altamente seguras (LIU; DAI; WANG; HU *et al.*, 2016). Por serem semelhantes aos vírus inteiros, em seu tamanho

e forma, conseguem estimular fortemente a reposta imune mediada tanto por células B quanto T, inclusive tendo efeito adjuvante (CIMICA; GALARZA, 2017). Adicionalmente, VLPs podem ser usadas como plataformas de apresentação de antígenos heterólogos, esta estratégia pode alterar radicalmente a magnitude da resposta imune trazendo benefícios significativos no aumento das taxas de proteção de novas vacinas (CIMICA; GALARZA, 2017; CRISCI; BARCENA; MONTOYA, 2012; LIU; DAI; WANG; HU *et al.*, 2016).

Como mostrado acima, esta foi a estratégia adotada na construção da vacina RTS,S, e quem sem dúvidas contribuiu de maneira crucial para o sucesso do projeto. As vantagens das VLPs, são amplamente conhecidas e tornam sua utilização atrativa, todavia, já foram relatados dificuldades técnicas no uso desta estratégia, como: baixo rendimento, necessidade de metodologias de purificação mais elaboradas e baixa estabilidade durante armazenamento (DAI; WANG; DENG, 2018), além da possibilidade de geração de resposta imune de memória contra os componentes virais (SEKALY, 2008)

Portanto, tendo em mente estas potenciais desvantagens, neste projeto procuramos superar estas questões através da fusão da proteína CS com uma proteína viral de núcleo, e não com uma proteína da superfície (característica das VLPs). Para isso, utilizamos a proteína do nucleocapsídeo (NP) do vírus da caxumba, isto porque esta proteína possui a capacidade de formar partículas estáveis semelhantes ao nucleocapsídeo (NLP, do inglês "Núcleo Like Particle") quando empregando a levedura *P. pastoris* como sistema de expressão (SLIBINSKAS; ZVIRBLIENE; GEDVILAITE; SAMUEL *et al.*, 2003). Vale ressaltar que a soroprevalência para esta proteína viral é baixa em indivíduos imunizados com a vacina contra caxumba (ALLWINN; ZEIDLER; STEINHAGEN; ROHWADER *et al.*, 2011).

Acreditamos então que, com esta abordagem, podemos potencializar a resposta imune das formulações vacinais desenvolvidas, sem que haja prejuízos na geração de anticorpos específicos contra o antígeno PvCSP, quando empregado uma proteína viral como sistema de entrega.

Ao final deste projeto esperamos ter definidos os protocolos de vacinações experimentais que possam servir como base para futuras avaliações pré-clínicas nos testes de uma vacina universal contra a malária causada pelo *P. vivax*.

2. OBJETIVOS

No presente projeto, foi nosso objetivo global desenvolver novas formulações vacinais visando a geração de uma resposta imune efetiva contra todas as variantes do *P. vivax.* Para tal, utilizamos proteínas recombinantes expressando a Proteína Circumsporozoíta de *P. vivax* para testes de imunogenicidade e proteção em camundongos.

Objetivos específicos:

- 1) Expressão, purificação e caracterização de duas proteínas recombinantes expressas em *P. pastoris* contendo as três regiões repetidas da proteína CS de *P. vivax* em fusão com a nucleocapsídeo do vírus da caxumba como *Nucleo like particles* (NLP);
- 2) Análise do efeito comparativo da imunogenicidade em camundongos isogênicos C57BL/6 utilizando as NLPs na presença dos adjuvantes Montanide ISA 720 ou Poly (I:C), através de ensaios de ELISA.
- 3) Utilização das proteínas recombinantes em protocolos de vacinação do tipo homólogo (proteína/proteína) em camundongos isogênicos C57BL/6 para análise da imunidade protetora após o desafio com parasitos *P. berghei* expressando as proteínas CS de *P. vivax*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Sequências das proteínas recombinantes

As sequências de nucleotídeos codificando para a as proteínas recombinantes foram sintetizadas com otimização de códon para a expressão em *P. pastoris* pela empresa GenScript. Nas proteínas da fusão com NLP, um *linker* de 7 aminoácidos (GAAGAGA) foi introduzido entre os genes da nucleocapsídeo do vírus da caxumba (NP) e os *repeats* das variantes alélicas de PvCSP.

A proteína NLP-CSP_{CT} possui a Região I (N-terminal), sequências representativas das três variantes de repetições de aminoácidos (VK210, VK247 e *P. vivax-like*) e o domínio C-terminal da proteína CSP. A proteína NLP-CSP_R representa apenas a Região I (N-terminal) e as variantes de repetições da proteína CSP. Todas as proteínas possuem uma cauda de hexa-Histidina para possibilitar a posterior purificação por cromatografia de afinidade em resina de Níquel.

Abaixo as sequências das proteínas e polipeptídeos recombinantes utilizados neste trabalho (Repetições de VK210 realçado em amarelo, VK247 em verde, *P. vivax-like* em azul, *linker* de 7 aminoácidos em cinza, e a sequência da nucleocapsídeo do vírus da caxumba em rosa e a representação gráfica das mesmas (Figura 7)

NLP-CSPcT

MSSVLKAFERFTIEQELQDRGEEGAIPPETLKSAVKVFVINTPNPTTRYQMLNFCLRIICS
QNARASHRVGALITLFSLPSAGMQNHIRLADRSPEAQIERCEIDGFEPGTYRLIPNARAN
LTANEIAAYALLADDLPPTINNGTPYVHADVEGQPCDEIEQFLDRCYSVLIQAWVMVCK
CMTAYDQPAGSADRRFAKYQQQGRLEARYMLQPEAQRLIQTAIRKSLVVRQYLTFELQ
LARRQGLLSNRYYAMVGDIGKYIENSGLTAFFLTLKYALGTKWSPLSLAAFTGELTKLRS
LMMLYRDLGEQARYLALLEAPQIMDFAPGGYPLIFSYAMGVGTVLDVQMRNYTYARPF
LNGYYFQIGVETARRQQGTVDNRVADDLGLTPEQRTEVTQLVDRLARGRGAGIPGGP
VNPFVPPVQQQQPAAVYEDIPALEESDDDDNEDGGAGFQNGAQAPAARQGGQNDFR
VQPLQDPIQAQLFMPLYPQVSNIPNHQNHQINRIGGMEHQDLLRYNENGDSQQDARG
EHGNTFPNNPNQNAQSQVGDWDEGAAGAGAPRENKLKQPGPGDRADGQPAGDRA
DGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDRADGQPAGDRADAPGANQEG
GAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANQE
GGAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANQE
GGAAAANGAGNQPGANGAGNQPGANGAGNQPGANGAGNQPGDRAA
GQAAGGNAGGQGQNNEGANAPNEKSVKEYLDKVRATVGTEWTPCSVTCGVGVRVR
RRVNAANKKPEDLTLNDLETDVCTHHHHHH*

NLP-CSP_R

MSSVLKAFERFTIEQELQDRGEEGAIPPETLKSAVKVFVINTPNPTTRYQMLNFCLRIICS
QNARASHRVGALITLFSLPSAGMQNHIRLADRSPEAQIERCEIDGFEPGTYRLIPNARAN
LTANEIAAYALLADDLPPTINNGTPYVHADVEGQPCDEIEQFLDRCYSVLIQAWVMVCK
CMTAYDQPAGSADRRFAKYQQQGRLEARYMLQPEAQRLIQTAIRKSLVVRQYLTFELQ
LARRQGLLSNRYYAMVGDIGKYIENSGLTAFFLTLKYALGTKWSPLSLAAFTGELTKLRS
LMMLYRDLGEQARYLALLEAPQIMDFAPGGYPLIFSYAMGVGTVLDVQMRNYTYARPF
LNGYYFQIGVETARRQQGTVDNRVADDLGLTPEQRTEVTQLVDRLARGRGAGIPGGP
VNPFVPPVQQQQPAAVYEDIPALEESDDDDNEDGGAGFQNGAQAPAARQGGQNDFR
VQPLQDPIQAQLFMPLYPQVSNIPNHQNHQINRIGGMEHQDLLRYNENGDSQQDARG
EHGNTFPNNPNQNAQSQVGDWDEGAAGAGAPENKLKQPGPGDRADGQPAGDRA
DGQPAGDRAAGQPAGDRAAGQPAGDRADGQPAGDRADAPGANQEG
GAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANQEGGAAAPGANQE



GGAAAANGAGNQPGANGAGNQPGANGAGNQPGANGAGNQPGHHH

HHH*

Figura 7. Esquema representativo das proteínas NLP-CSP_{CT} **e NLP-CSP**_R. Em roxo a sequência da proteína de nucleocapsídeo do vírus da caxumba, em amarelo a sequência da variante de VK210, em azul de *P. vivax-like*, em verde de VK247 e em cinza a região C-terminal, ambos pertencentes a proteína CS de *P. vivax*.

3.2. Obtenção de leveduras *P. pastoris* transformadas com os vetores de expressão para as proteínas recombinantes.

As sequências acima descritas estão clonadas dentro dos sítios de restrição *Eco*RI e *Not*I nos plasmídeos pPIC9K (Invitrogen) para a expressão sob o controle do promotor metanol indutível AOX1. Leveduras da linhagem GS115 (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc), foram transformadas por eletroporação com os plasmídios linearizados pelas enzimas *SaI*I ou *BgI*II (New England Biolabs). As leveduras transformadas foram cultivadas em placas de meio deficiente em histidina para a primeira seleção dos clones HIS+. A seleção de clones com inserções múltiplas foi feita em placas de YPD contendo geneticina (concentração final de 0.25 a 4.0 mg/mI). Os detalhes dos meios e placas de cultura da levedura foram seguidos a partir do manual de usuário da Invitrogen para *P. pastoris*.

3.3. Expressão das proteínas recombinantes a partir da levedura *P. pastoris*.

Para a expressão das proteínas recombinantes, leveduras transformadas como conforme item 3.2, foram cultivadas por 24 horas a 30°C, sob agitação constante (230 rpm), em 40-200 mL de meio contendo glicerol 3% (BMGY). Após este período, as células foram recolhidas por centrifugação, solubilizadas em 40-200 mL de meio contendo 1,0% de metanol (BMMY) e cultivadas a 28°C, sob agitação constante (230 rpm). A indução foi mantida pela adição diária de metanol na concentração final de 1,0% durante 72-96 horas de incubação.

As células de clones foram removidas por centrifugação e os sobrenadantes foram concentrados por filtração em membranas de 0,45 µm. Posteriormente, os sobrenadantes das culturas contendo a proteína secretada foram dialisados contra o tampão de equilíbrio.

3.4. Purificação das proteínas recombinantes

As purificações das proteínas recombinantes envolvidas no projeto foram realizadas em 2 etapas cromatográficas, afinidade e troca iônica. Inicialmente o sobrenadante contendo a proteína solubilizada foi submetido à cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de níquel HisTrap™FF (GE Healthcare USA Inc., Pittsburgh, PA) acoplada ao sistema FPLC ÄKTA prime plus (GE Healthcare USA Inc.). A eluição ocorreu contra um gradiente de imidazol (15-400 mM, USB, Affymetrix USA Inc., Santa Clara, CA) em tampão fosfato-cloreto [(20 mM NaH₂PO₄ (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.), 20 mM Na₂HPO₄ (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.), 0,5 M NaCl (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.)], pH=6,0.

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

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

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

As eletroforeses foram realizadas de acordo com protocolos estabelecidos pelo grupo. Os géis de empilhamento foram obtidos utilizando 3% de acrilamida/bis-

acrilamida, a partir das soluções estoque [12% (m/v) acrilamida (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.), 1,2% (m/v) bis-acrilamida (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) e 0,25 mM Tris (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.), 0,2% (m/v) dodecil sulfato de sódio (SDS, Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.)] e polimerizados utilizando 0,1% (m/v) de persulfato de amônio (Sigma-Aldrich USA Co. LLC) e 12 μL de TEMED (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) para 5 mL de solução final. Os géis de separação foram obtidos utilizando 12% ou 15% de acrilamida/bis-acrilamida, a partir de soluções estoque [30% (m/v) acrilamida, 0,8% (m/v) bis-acrilamida e 0,75 mM Tris, 0,2% (m/v) SDS] e polimerizados utilizando 0,1% (m/v) de persulfato de amônio e 12 μL de TEMED para 9 mL de solução final.

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

3.6. Ensaio de *Immunobloting*

As proteínas recombinantes NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 12% conforme descrito anteriormente, e após esta, as amostras separadas no gel de acrilamida/bis-acrilamida foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose Hybond N (GE Healthcare USA Inc.) em tampão de transferência (160 mM glicina, 25 mM Tris e 20% (v/v) metanol) a 90 V por 30 minutos, utilizando o sistema de transferência semi-úmida Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories USA Inc.). As membranas foram coradas com solução Ponceau-S (0,1% Ponceau red (Bio-Rad Laboratories USA Inc.) e 10% ácido acético) para confirmação da transferência, e em seguida foram incubadas por 16-18 horas, a

4°C, em solução de bloqueio [5% (m/v) leite em pó desnatado (Molico®, Nestlé CHE S.A., Vevey, VD), 2,5% (m/v) albumina sérica bovina em PBS].

Após este período, as membranas foram incubadas por 1 hora a T.A., com os anticorpos monoclonais primários anti-*Pv*CSP-VK210 (2F2) e anti-*Pv*CSP-VK247 (2E10.E9) gerados pelo Dr. Alan Cochrane (dados não publicados) ou anti-caxumba-NP (7B10) (Abcam; Ab9880) na diluição de 1:2.000 (v/v) ou anticorpo policlonal anti-*P. vivax* like na diluição de 1:2.000, (v/v), sob condições reduzidas. Após 3 lavagens de 10 minutos com PBS-T [0,05% Tween 20, (v/v), Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.], a membrana foi incubada com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories USA Inc., Gaithersburg, MA) na diluição de 1:3.000 em solução de bloqueio por 1 hora a T.A. Após 3 lavagens com PBS-T, a revelação por quimioluminescência, utilizando kit ECL *Western Blotting Analyses System* (GE Healthcare USA Inc.) ocorreu, em sala escura, expondo a membrana ao filme fotográfico (GE Healthcare USA Inc.) e este às soluções de revelação e fixação (Eastman Kodak USA Co., Rochester, NY).

3.7. Cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) das NLPs

As proteínas recombinantes NLP-CSPct e NLP-CSPR purificadas, foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) utilizando uma coluna C4 Vydac (4,6 mm × 250 mm, para partículas de 300 Hm) em um sistema HPLC Shimadzu LC Solution (Shimadzu JPN Corp., Kyoto, KY). O procedimento foi realizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas. Utilizou-se um gradiente de acetonitrila (Merck KGaA DEU Inc.) de 0-100% em 0,1% de ácido trifluoracético (TFA, Thermo Fisher Scientific USA Inc.) / 90% acetonitrila a aproximadamente 24°C, sob um fluxo de 1 mL/minuto por 40 minutos. A eluição foi monitorada com um detector de absorbância UV-visível (Shimadzu SPD M20A, Shimadzu JPN Corp.) a 214 nm (GIMENEZ; LIMA; FRANCOSO; DENAPOLI *et al.*, 2017).

3.8. Dicroísmo Circular

Os ensaios dicroísmo circular (DC) foram de realizados no espectropolarímetro JASCO-J810 (Jasco ITA Corp., Milano, MI) equipado com um sistema de controle de temperatura contínuo da Central Analítica (CA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil). As proteínas recombinantes NLP-CSPcT e NLP-CSPR, acondicionadas em uma cubeta de quartzo de 5 mm, sofreram 8 scans UV realizados na velocidade de 20 nm/minuto, entre os comprimentos de onda 260-200 nm com 1 nm de bandwidth para respostas de 1 segundo a 20°C. Os espectros foram corrigidos subtraindo o sinal do tampão (PBS) e a elipticidade molar (θ) foi calculada para predição das estruturas secundárias das proteínas recombinantes utilizando o software CDNN Secundary Structure Analysis (Applied Photophysics GBR Ltd., Leatherhead, SU).

3.9. Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram diluídas para a concentração de 2 µg, e as mesmas foram depositadas em grades de microscopia eletrônica revestidas com Formvar-carbono (EMS # FCFT200-Cu). As grades foram cobertas e as amostram foram absorvidas por 20 minutos em um ambiente seco. O volume de 100 µL de água destilada foi colocada em uma folha de parafilme, então as grades com o lado da membrana para baixo foram colocadas por 2 minutos para lavar, em seguida, as grades foram transferidas para 100 µL de 50% de glutaraldeído 1% (Sigma-Aldrich # G5882) por 5 minutos e novamente para a gota de água destilada por 2 minutos. Este passo foi repetido sete vezes. Para contrastar, as grades foram colocadas em 50 µL de 4% de acetato de uranila (EMS, # 22400) por 7 minutos e examinadas no dia seguinte em microscopia eletrônica de transmissão, utilizando o microscópio Tecnai FEI G20 a 200 kV no Centro de Microscopia do Departamento de Desenvolvimento e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob supervisão do Professor Ii Sei Watanabe.

3.10. Imunização de camundongos

A fim de determinar qual a melhor formulação de antígenos a ser utilizada, fizemos uma comparação da resposta imune contra diferentes proteínas recombinantes após imunizações combinadas. Camundongos fêmeas C57BL/6, de 6 a 8 semanas de vida, foram imunizados s.c. com 10 µg de cada proteína recombinante/dose/animal, conforme esquema apresentado na figura 8. Estes protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da FCF-USP (CEUA/FCF 74.2016-P531). As tabelas a seguir descrevem o esquema de imunização adotado para cada experimento.

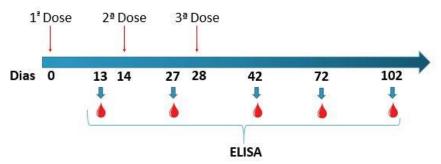


Figura 8. Esquema de imunização e coleta de soro para análise.

Tabela 1. *Prime-boost* homólogo utilizando as proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R e Poly (I:C) como adjuvante

Grupo	Prime	Boost (2x)	Nº (Animais)	Dose/animal
G1	Poly (I:C)	Poly (I:C)	6	50 μg
G2	NLP-CSP _{CT}	NLP-CSP _{CT}	6	10 μg
G3	NLP-CSP _R	NLP-CSP _R	6	10 μg

Tabela 2. *Prime-boost* homólogo utilizando as proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R e Montanide ISA 720 como adjuvante

Grupo	Prime	Boost (2x)	N⁰ (Animais)	Dose/animal
G1	Montanide ISA 720	Montanide ISA 720	6	3:7 (v/v)
G2	VLP-PvCS _{CT}	VLP-PvCS _{CT}	6	10 µg
G3	VLP-PvCS _{REPEATS}	VLP-PvCS _{REPEATS}	6	10 µg

3.11. Dosagem de anticorpos IgG, especificidade e isotipos de IgG induzidos pelas imunizações experimentais em camundongos.

Para a determinação dos títulos de anticorpos contra as proteínas homologas ou contra as variantes alélicas (especificidade), placas de 96 poços modelo *high binding costar* 3590 (Corning, Sigma-Aldrich USA Co. LLC, St Louis, MO) foram

sensibilizadas com 200 ng da proteína homóloga NLP-CSPcT ou NLP-CSPR, as FliC-PvCSP-repeats (LEAL; CAMACHO; TEIXEIRA; BARGIERI et al., 2013) (VK210, VK247 ou P. vivax-like) ou a proteína NP-caxumba (Abcam; ab74560), em tampão carbonato-bicarbonato [Na₂CO₃ (0,01 M), NaHCO₃ (0,03 M), (pH=9,6)]. Essas concentrações foram ajustadas de modo que todas as proteínas fossem reconhecidas de forma semelhante pelo anticorpo monoclonal anti-His. As placas foram incubadas 16-18 horas a T.A., e após esse período, lavadas 3 vezes com PBS-T seguidas da adição de 200 µL/poço de solução leite-PBS [leite desnatado (5%) (m/v) e PBS, (pH=7,4)], por 2 horas a 37°C, para bloqueio dos sítios inespecíficos. O soro recolhido dos camundongos foi testado em diluições seriadas, a partir de 1:100, em um volume de 50 µL, seguido por uma incubação de 1 hora, T.A. Após 3 lavagens com PBS-T, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo secundário de camundongo anti-IgG conjugado a peroxidase (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories USA Inc.), diluído 1:3.000 em solução de bloqueio, 1 hora a T.A., com posterior lavagem com PBS-T por 3 vezes. A reação enzimática ocorreu pela adição de 1 mg/mL de o-p-fenilenediamina (OPD, Sigma-Aldrich USA Co. LLC) e 0,1% (v/v) (Merck KGaA DEU Inc.])de H₂O₂ diluídos em tampão fosfato-citrato [200 mM Na₂HPO₄ (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.)], 218 mM C₆H₈O₇ (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.); pH=4,8-4,9, interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 4N (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.) e as DO₄₉₂ determinadas.

A detecção de anticorpos IgG1, IgG2b, IgG2c e IgG3 nos camundongos imunizados, foi realizada como descrito acima, exceto que o anticorpo secundário foi substituído por anticorpos isotipo-específicos de camundongo (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG2c e anti-IgG3) conjugados a peroxidase (Southern Technologies USA Corp., Lake Charles, LA) em uma diluição de 1:3.000.

Os títulos de anticorpos específicos foram definidos como a maior diluição com uma DO₄₉₂ superior a 0,1. Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos em log10 ± erro padrão da média (SEM) (GIMENEZ; LIMA; FRANCOSO; DENAPOLI *et al.*, 2017).

3.12. ELISPOT de células B

O ensaio de ELISPOT foi realizado para enumeração de células secretoras de IgG específicas e totais. Para o coating foram utilizadas placas de ELISPOT (Millipore MSHAN4B50). Inicialmente, 1 µg/mL de cada uma das proteínas recombinantes separadamente [yPvCSP-AllCT, NLP-CSPCT, FliC-VK210, FliC-VK247, FliC-Pv-like No repeats (que contém somente as regiões N e C-terminal da proteína CS) ou NP-Caxumba (que contém somente o nucleocapsídeo do vírus da caxumba) e para enumeração de células secretoras de IgG totais, foi utilizado um anticorpo IgM de captura (Jackson ImmunoResearch)] as placas foram incubadas overnight a 4°C. No dia seguinte as mesmas foram lavadas 4 vezes com PBS-T 1X -0,05% Tween 20 (PBS - 0,05%T20) e 4 vezes com PBS. Em seguida, bloqueadas por 2 horas com meio de cultura RPMI-10%FBS. Depois do bloqueio, o meio de cultura foi removido das placas e cerca de 5x105 de esplenócitos e células da medula óssea foram isolados, contados e plaqueados em diluições de 3 vezes em série em meio R10. As placas ELISPOT foram incubadas por período overnight a 37°C em estufa de 5% de CO₂. Depois, as células foram removidas por inversão e as placas lavadas 4 vezes com solução de PBS-T. Depois, uma solução de anticorpos secundários biotinilados anti-IgG (Jackson ImmunoResearch) de camundongos, diluídos 1:1.000 em solução de PBS - 0,05% Tween 20 - 2% FBS, foram incubadas individualmente por 90 minutos, a temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, as placas foram lavadas novamente por 4 vezes com solução PBS - 0,05%T20 por 4 vezes e uma solução de *Avidin* D - HRP (Vector labs), diluída 1:3.000 em PBS - 0,05% Tween 20 - 2% FBS, foi adicionada. A incubação com Avidin foi realizada por 2 horas à temperatura ambiente, no escuro. As placas foram lavadas, novamente, por 4 vezes com solução PBS-T e 4 vezes com solução PBS. Por fim, o ensaio foi revelado a partir da adição do substrato filtrado 3-amino 9etilcarbazol (AEC - BD™ ELISPOT cat 551951) às placas. Após revelação, todos os poços foram lavados com água corrente e as placas, secas e mantidas no escuro até obtenção das imagens de cada poço através do leitor automatizado AID ISPOT (AID – Autoimunn Diagnostika GmbH, Alemanha) (FABRIS; NUNES; SCHUCH; DE PAULA-SILVA et al., 2020).

3.13. Desafio utilizando parasitos transgênicos

3.13.1. Parasitos, camundongos e mosquitos

Utilizamos esporozoítos (SPZ) do *P. berghei* ANKA expressando os *repeats* VK210 da proteína CSP de *P. vivax* (Pb/PvVK210), conforme descrito (YADAVA; SATTABONGKOT; WASHINGTON; WARE *et al.*, 2007). Os camundongos C57BL/6JRj foram adquiridos na Janvier Labs. Todas os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais do *Institut Pasteur* (CETEA *Institut Pasteur* 2013-0093, *Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche* MESR 01324) e foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentos europeus (*directive* 2010/63/EU). Para todos os testes, fêmeas de 6 a 8 semanas foram usadas e alocadas aleatoriamente em gaiolas. Dois experimentos independentes de imunização/desafio foram realizados usando 7 animais por grupo.

Mosquitos *Anopheles stephensi* (linhagem SDA500) foram criados no Centro de Produção e Infecção de Anófeles (CEPIA) no Institut Pasteur usando procedimentos padrão. Para a produção *Plasmodium spp.* SPZs, mosquitos foram alimentados com sangue de camundongos RjOrl:SWISS infectados, 1–2 dias após a eclosão e mantidos em câmara umidificada a 21°C. Uma semana após a infecção, os mosquitos infectados com Pb/PvVK210 foram alimentados novamente com sangue de camundongos RjOrl:SWISS *naive*. Para as injeções na planta do pé, foram coletadas Pb/PvVK210 SPZs das glândulas salivares infectadas 21–28 dias após a última alimentação dos mosquitos (ALIPRANDINI; TAVARES; PANATIERI; THIBERGE *et al.*, 2018).

3.13.2. Desafio com os esporozoítos

Os SPZs transgênicos Pb/PvVK210 foram mantidos em mosquitos fêmeas de *Anopheles stephensi*, como descrito acima. O número total de SPZs foi determinado usando uma lâmina de vidro Kova e 5.000 SPZs em 1µL de PBS foram microinjetados intradérmicamente na base da pata dos camundongos, usando uma seringa NanoFil (World Precision Instruments).

A parasitemia foi determinada por citometria de fluxo, uma vez que os parasitos trangenicos expressam a proteína verde fluorescente (GFP do inglês green fluorescent protein) e realizada do dia 4 ao dia 10 após o desafio, onde 200.000 eritrócitos foram examinados para cada amostra. A análise quantitativa das

hemácias parasitadas foi determinada usando o log da parasitemia no dia 5 após a infecção, quando os parasitos no sangue ainda estão crescendo exponencialmente (ALIPRANDINI; TAVARES; PANATIERI; THIBERGE *et al.*, 2018). O Teste ANOVA, seguido do teste Tukey, foram aplicados. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando P < 0.05.

3.14. Sorologia contra o vírus da caxumba

Para a determinação da sorologia contra o vírus da caxumba, as amostras foram divididas em dois grupos. O primeiro são indivíduos que vivem em áreas endêmicas para *P. vivax*, e o segundo são indivíduos que vivem em área não endêmica e que sabidamente foram imunizados com a vacina contra caxumba. Primeiramente selecionamos pacientes não infectados e sabidamente imunizados com a vacina tríplice viral ou que foram infectados naturalmente pelo vírus da caxumba (12 pacientes de São Paulo), pacientes não infectados com *P. vivax* no momento da coleta, de áreas endêmicas (8 pacientes de Macapá, 32 de Belém) e pacientes infectados com *P. vivax* no momento da coleta de áreas endêmicas (16 de Porto Velho/Macapá e 24 de Goianésia).

O teste ELISA foi executado utilizando o kit Euroimmun (cod. El2630-9601-G Caxumba – IgG), de acordo com as instruções do fabricante.

4. RESULTADOS

4.1. Expressão e purificação das proteínas NLP-CSPcT e NLP-CSPR.

O objetivo desta etapa foi a expressão e purificação das proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R com a finalidade de serem utilizadas nos protocolos de imunização.

A figura 9 demonstra o resultado da expressão das proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R em meio BMGY (meio repressor) e BMMY (meio indutor), no sobrenadante da cultura, no decorrer de 72 horas com suplementação de 1% de metanol a cada 24 horas.

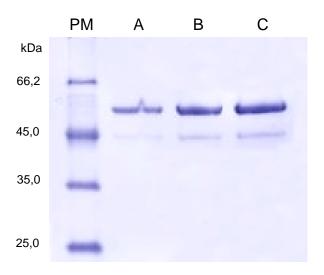


Figura 9. Curva representativa da expressão da proteína NLP-CSP_{CT}. A análise por SDS-PAGE referente a expressão da NLP-CSP_{CT} em *P. pastoris* foi feita sob condições redutoras em gel de poliacrilamida a 12%. As letras **A**, **B**, **C** representam o processo de expressão da proteína NLP-CSP_{CT}, nos tempos de 24h, 48h e 72h respectivamente, após a indução com metanol a 1% (v/v). PM representa o marcador de massa molecular.

Como é possível observar, após 72 horas de processo, o nível de expressão foi satisfatório, apresentando bom rendimento de cada proteína. As referidas proteínas possuem padrão de migração de massa molecular entre 50-55kDa, não apresentaram degradação visível. Assim, utilizamos os sobrenadantes para as etapas de purificação.

4.2. Purificação das proteínas NLP-CSPcT e NLP-CSPR

Aplicamos estas duas metodologias de purificação com a finalidade de se obter proteínas no mais alto grau de pureza, para que assim, as mesmas possam ser utilizadas nas próximas etapas do projeto.

Os cromatogramas do processo de purificação estão representados na Figura 10, após a purificação por afinidade em coluna de níquel e por troca-iônica.

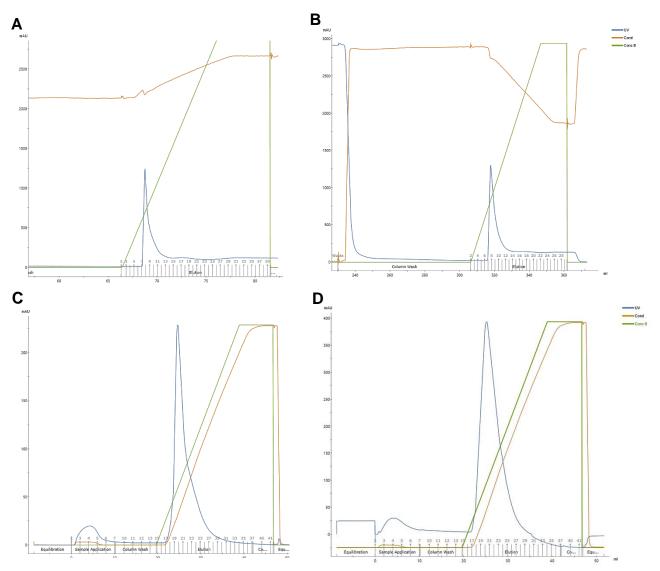


Figura 10. Purificação das proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R por cromatografia de afinidade e troca-iônica. As figuras (A) e (B) representam os cromatogramas da purificação por afinidade das proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R respectivamente. As amostras foram injetadas em solução de equilíbrio, contendo tampão fosfato 20 mM e NaCl 0,5 M e coletadas em solução de eluição, contendo tampão fosfato 20 mM, NaCl 0,5 M e imidazol 0,5 M. As figuras (C) e (D) representam as mesmas proteínas que, posteriormente a cromatografia por afinidade, foram purificadas em cromatografia de troca-iônica. As amostras foram injetadas em tampão Tris-HCl pH 8,0 20 mM e eluídas em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e NaCl 50 mM. O eixo das abcissas representa o tempo de corrida e as frações onde foram coletados os picos da amostra e no eixo das ordenadas está representado a intensidade de absorbância do pico (mAU). As frações contendo os picos foram coletadas e dialisadas em tampão Tris-HCl 20 mM (após cromatografia por afinidade) ou PBS (após cromatografia por troca-iônica) *overnight*.

Com as duas diferentes metodologias de purificação foi possível obter as proteínas em concentração e pureza adequadas para serem utilizadas nas etapas de caracterização biofísica e posteriormente nas imunizações experimentais.

4.3. Caracterização biofísica das proteínas NLP-CSPcT e NLP-CSPR.

4.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

Após as etapas de purificação, as proteínas foram submetidas à avaliação quanto a sua pureza através da cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC), metodologia de alta sensibilidade, capaz de detectar contaminantes presentas nas amostras, sejam eles provenientes de uma purificação de baixa eficiência ou produto de degradação das proteínas. Os cromatogramas abaixo (Figura 11) representam a avaliação do grau de pureza de cada uma das proteínas analisadas.

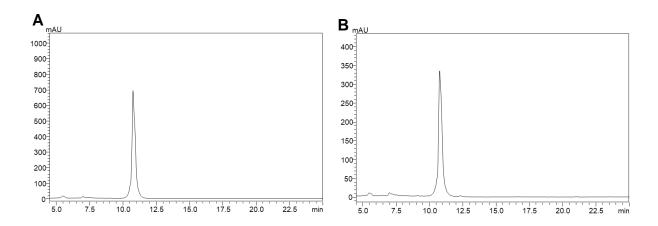


Figura 11. Cromatogramas representativos obtidos por RP-HPLC das proteínas recombinantes NLP-CSP_{CT} **e NLP-CSP**_{R.} Cromatograma de RP-HPLC, utilizando um gradiente de eluição combinando tampão "A" [TFA (0,1%) (v/v), água) e "B" (TFA (0,1 %) (v/v), acetonitrila (90%) (v/v)], 24°C, 1 mL/minuto por 40 minutos, em uma coluna C4. A figura **(A)** referente a proteína NLP-CSP_{CT} e a figura **(B)** NLP-CSP_{R.}

É possível observar um pico majoritário em cada um dos cromatogramas, concluindo que as amostras se encontram puras e sem produtos de degradações em níveis detectáveis, demonstrando que as etapas de purificação foram eficientes.

4.3.2. Immunoblotting

Os ensaios de *immunoblotting* também foram realizados após a purificação das proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R. Este ensaio possui como finalidade confirmar que as proteínas foram expressas em sua integralidade, mostrando o reconhecimento dos epitopos das mesmas por anticorpos monoclonais, como apresentado na figura 12.

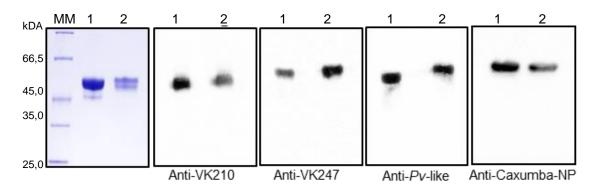


Figura 12. Immunobloting em condições redutoras das proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R. As proteinas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R são representadas em todas as imagens nas linhas 1 e 2, respectivamente. A figura representa o gel de SDS-PAGE a 12% em condições redutoras (2μg de carda proteína por poço) onde MM significa massa moleucar e mostrando o padrão de migração entre 50-55 kDa. Os demais figuras representam as proteínas sendo reconhecidas por anticorpos monoclonais anti-VK210 e anti-VK247, e NP-caxumba e pelo anticorpo policlonal anti-P. vivax-like no ensaio de western blotting.

É possível observar que as proteínas purificadas são reconhecidas por anticorpos monoclonais (mAb) (mAb VK210 2F2 e mAb VK247 2E10.E9), assim como por anticorpos policionais anti-*P. vivax*-like (GIMENEZ; LIMA; FRANCOSO; DENAPOLI *et al.*, 2017) e por mAb anti-nucleocapsídio do vírus da caxumba (mAb 7V10). Com este ensaio, concluímos que as proteínas além de puras, foram expressas integralmente, como esperado, não ocorrendo perda de epítopos, mantendo-se em conformação adequada para serem reconhecidas por anticorpos monoclonais específicos.

4.3.3. Dicroísmo circular

O Dicroísmo circular ou CD (do inglês *Circular Dichroism*) é uma técnica espectroscópica que tem como base a medida da absorbância diferencial entre as duas rotações de luz circularmente polarizada por uma molécula assimétrica. Quando as proteínas interagem com a luz circularmente polarizada, provocam uma alteração nessa luz incidente, produzindo um gráfico do comprimento de onda (nm) pela variação ótica em miligraus (mDeg). Como resultado final, obtemos informações cruciais da estrutura secundária de uma proteína em solução.

As leituras dos ensaios de dicroísmo circular (Figura 13) foram obtidos de cada amostra e deconvoluídos utilizando o programa CDNN Secundary Structure Analysis para se obter os gráficos apresentados abaixo.

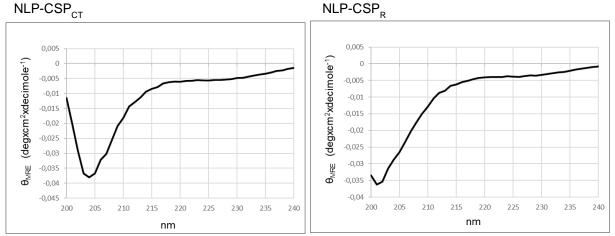


Figura 13. Espectro de dicroísmo circular das proteínas NLP-CSP_{CT} **e NLP-CSP**_{R.} Os gráficos foram plotados a partir da normalização de 8 leituras acumulativas de cada proteína.

Os resultados mostraram bandas negativas próximo a região de 222 e 208 nm, correspondente às proteínas que possuem estruturas randômicas. As percentagens estimadas de α -hélix, folhas β (antiparalelas, paralelas) e *random coil* estimadas, encontram-se na tabela 3. Como avaliação final, as diferenças nos padrões dos espectros próximos de 200nm sugerem maior estabilidade da proteína NLP-CSP_{CT}.

Tabela 3. Composição da estrutura secundária das proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R após deconvolução.

	α-hélices	Folhas β antiparalelas	Folhas β paralelas	Ligações entre folhas β	Randômicas
NLP-CSP _{CT}	14,4	19,1	17,2	22,0	49,3
NLP-CSP _R	13,2	20,3	18,2	22,4	50,9

4.3.4. Microscopia eletrônica de transmissão

A análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das proteínas NLP purificadas, teve como objetivo confirmar de forma visual a formação das partículas semelhantes as estruturas virais. Esta técnica é empregada na maioria dos trabalhos que envolvem o desenvolvimento de plataformas baseadas VLPs.

Os resultados revelaram grandes quantidades de estruturas circulares, o que mostrou algumas características em comum com as VLPs. (Figura 14). Essas estruturas circulares apareceram como formas flexíveis de 15-20 nm de diâmetro. A formação de NLPs em sistemas de expressão utilizando leveduras ocorrem na ausência de outras proteínas virais, como descrito anteriormente (SLIBINSKAS; ZVIRBLIENE; GEDVILAITE; SAMUEL *et al.*, 2003).

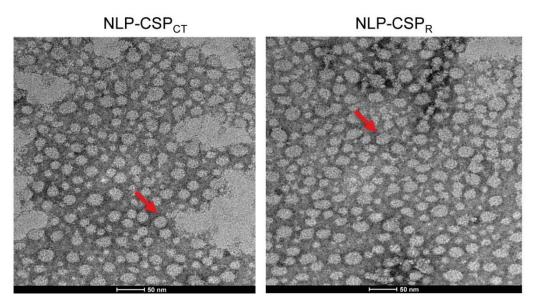


Figura 14. Caracterização das proteínas NLP-CSP_{CT} **ou NLP-CSP**_R **por MET.** As proteinas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R foram negativamente fixadas com 0,5% de acetato de uranila e vizualidos em microscópio eletrônico de varredura. As flechas em vermelho apontam as estruturas observadas.

Com a somatória de todos os resultados das análises executadas para realizar a caracterização biofísica das proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R, concluímos que ambas estavam aptas a seguirem para as próximas etapas, onde realizamos a caracterização imunológica das mesmas.

4.4. Caracterização imunológica das proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R 4.4.1. Expressão das variantes alélicas VK210, VK247 e *P. vivax* like utilizadas para o teste de ELISA.

Uma vez que o objetivo do grupo é a produção de uma vacina universal contra *P. vivax*, as proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R possuem as três variantes alélicas da proteína CSP predominantes no mundo, como descrito no item 1.5. Portanto, com a finalidade de avaliar individualmente a resposta de anticorpos contra cada variante alélica, as proteínas yPvCSP-VK210, yPvCSP-VK247 e yPvCSP-*P. vivax-like* foram expressas e purificadas para que posteriormente fossem utilizadas

no teste de ELISA. Os protocolos de expressão destas proteínas já foram estabelecidos anteriormente por Gimenez e colaboradores (GIMENEZ; LIMA; FRANCOSO; DENAPOLI *et al.*, 2017)

A figura 15 representa os cromatogramas das etapas de purificação por afinidade e o gel de SDS-PAGE a 12% mostrando cada proteína ao final do processo.

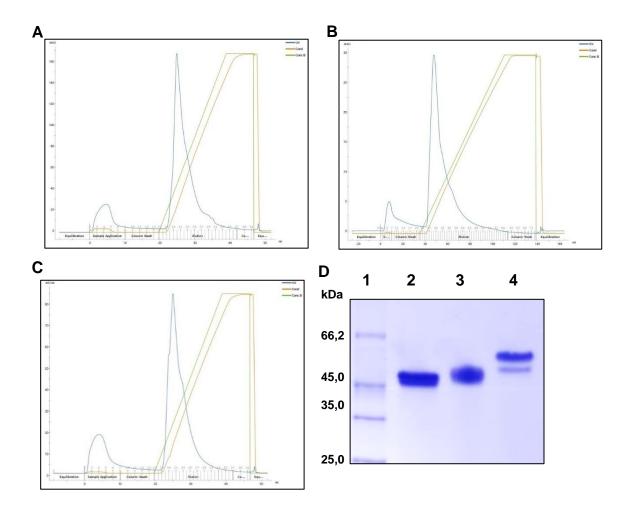


Figura 15. Cromatografia de troca-iônica - yPvCSP-VK210, yPvCSP-VK247 e yPvCSP-*P. vivax-like* e eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. As figuras (A), (B) e (C) representam os cromatogramas da purificação por cromatografia de afinidade das variantes yPvCSP-VK210, yPvCSP-VK247 e yPvCSP-*P. vivax-like*, respectivamente. As amostras foram injetadas em solução de equilíbrio contendo 20 mM de tampão fosfato e 0,5 M de NaCl e foram coletadas em solução de eluição contendo tampão fosfato 20 mM, 0,5 M de NaCl e 0,5 M de imidazol. No eixo das abcissas representa o tempo de corrida e as frações onde foram coletadas as amostras, no eixo das ordenadas é representado a intensidade de absorbância do pico (mAU). As frações contendo o pico foram coletadas e dialisadas em PBS *overnight*, para posteriormente serem quantificadas. A figura D – representa o gel de SDS-PAGE 12% sob condições redutoras corado com azul de coomassie. As proteínas possuem massa molecular entre 45-55 kDa. Foram aplicados 2 μg de: (1) PM, (2) yPvCSP-VK210, (3) yPvCSP-VK247 e (4) yPvCSP-*P. vivax-Like*

Todas as três proteínas foram obtidas com sucesso e em rendimento/pureza de acordo com os padrões estabelecidos, para aplicação nos ensaios de ELISA.

4.4.2. Avaliação da resposta de anticorpos em camundongos imunizados com NLP-CSP_{CT} ou NLP-CSP_R em esquema de imunização *prime-boost* homólogo na presença do adjuvante Poly (I:C).

Com a finalidade de avaliar a imunogenicidade bem como a magnitude da resposta imune mediada por anticorpos, as proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R foram formuladas utilizando o Poly (I:C) como adjuvante, como descrito na tabela 1. O Poly (I:C) é um análogo sintético de uma dupla fita de RNA (dsRNA) que ativa a via TLR3, RIG-I/MDA5 e PKR, induzindo a ativação de diversas vias inflamatórias, incluindo NF-kB e IRF (APOSTOLICO JDE; LUNARDELLI; COIRADA; BOSCARDIN et al., 2016; YAMAMOTO; SATO; HEMMI; HOSHINO et al., 2003; YU; LEVINE, 2011).

Os resultados estão apresentados na figura 14, e os anticorpos foram analisados individualmente contra cada alelo da PvCSP, após 14 dias de cada uma das três doses administradas. A diferença entre os títulos de anticorpos foi estatisticamente calculada. Este experimento foi realizado em dois ensaios independentes com a finalidade de confirmar os resultados obtidos.

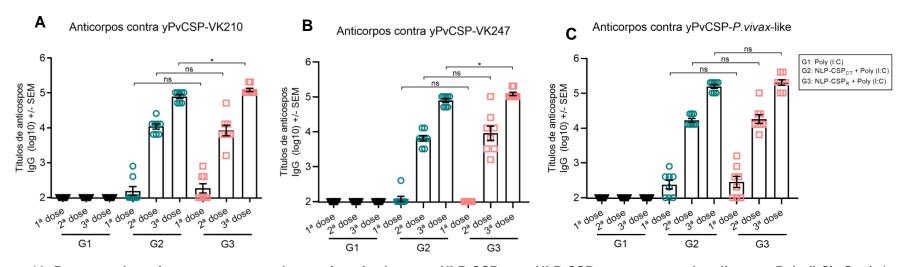


Figura 16. Resposta de anticorpos em camundongos imunizados com NLP-CSP_{CT} ou NLP-CSP_R na presença do adjuvante Poly (I:C). Os títulos de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes representando cada alelo da PvCSP (A VK210, B VK247 e C *P. vivax-like*) foram analisados por ELISA. Foram administradas 3 doses da formulação com intervalo de 14 dias entre cada uma. A concentração do adjuvante Poly (I:C) foi de 50μg/dose/animal em todos os grupos. Os grupos de camundongos foram imunizados com: (G1) Poly (I:C); (G2) NLP-CSP_{CT} (10μg/dose/camundongo) + Poly (I:C) e (G3) NLP-CSP_R (10μg/dose/camundongo) + Poly (I:C). Os resultados são expressos como os títulos da média aritmética de cada grupo em (log10 ± SEM erro padrão da média ±SEM, do inglês *standard error of the mean*), e foram comparados estatisticamente com teste ANOVA seguido pelo *Turkey test*. Diferenças significativas entre os grupos são indicadas no gráfico: Onde ns (não significativo) *P*> 0,05, **P*<0,05.

É possível constatar que as proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R, em repostas a ambas as variantes alélicas, geraram altos títulos de anticorpos após as três doses administradas. Para a maioria das comparações realizadas não houve diferença estatística, exceto quando comparado os títulos de anticorpos entre os grupos imunizados com a NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R após a terceira dose para a vPvCSP-VK-210 (*P*=0.0138) e vPvCSP-VK247 (*P*0.0300).

4.4.3. Determinação da longevidade dos anticorpos anti-NLP-CSP_{CT} e anti-NLP-CSP_R empregando Poly (I:C) como adjuvante.

A determinação da longevidade da resposta imune foi analisada a partir do experimento executado no item 4.4.2 onde o mesmo foi conduzido até o 102º dia, tendo como finalidade avaliar por quanto tempo os anticorpos se mantinham circulantes até o início de seu decaimento.

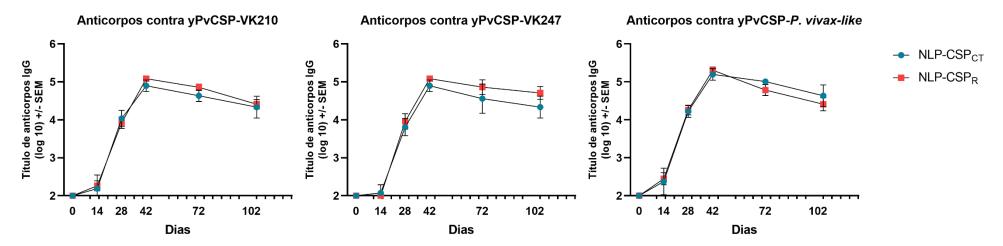


Figura 17. Avaliação da longevidade da resposta de anticorpos IgG em camundongos imunizados com as formulações contendo as proteínas NLP-CSP_{CT} ou NLP-CSP_R na presença do adjuvante Poly (I:C). Camundongos foram imunizados com 3 doses no intervalo de 14 dias cada. A longevidade foi monitorada por 102 dias. Foram administradas 3 doses da formulação com intervalo de 14 dias entre cada uma. A concentração do adjuvante Poly (I:C) foi de 50μg/dose/animal em todos os grupos. Os grupos de camundongos foram imunizados com: (G1) Poly (I:C); (G2) NLP-CSP_{CT} (10μg/dose/camundongo) + Poly (I:C).

Ao final do experimento foi possível notar uma queda no título de anticorpos para ambas as formulações e em resposta para as diferentes variantes alélicas de PvCSP, contudo o mesmo ocorreu de forma gradativa, o que já era esperado.

4.4.4. Avaliação da resposta de anticorpos em camundongos imunizados com NLP-CSP_{CT} ou NLP-CSP_R em esquema de imunização *prime-boost* homólogo emulsionado com o adjuvante Montanide ISA 720.

Assim como descrito no ensaio anterior, utilizando Poly (I:C), os mesmos parâmetros foram aplicados para este experimento, porém utilizando o Montanide ISA 720 como adjuvante como descrito na Tabela 2 e os gráficos com os títulos de anticorpos contra cada variante representados na figura 18.

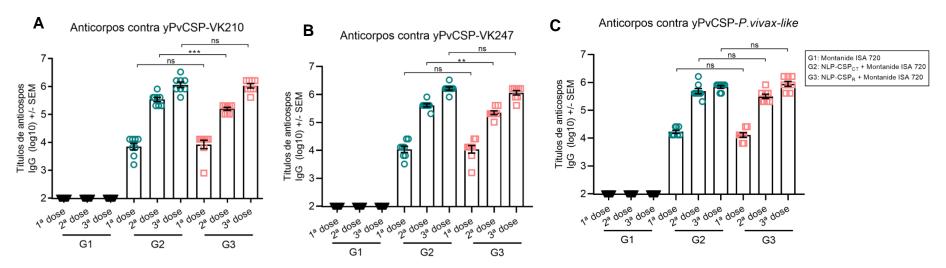


Figura 18. Resposta de anticorpos em camundongos imunizados com NLP-CSP_{CT} ou NLP-CSP_R na presença do adjuvante Montanide ISA 720. Os títulos de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes representando cada alelo da PvCSP (A VK210, B VK247 e C *P. vivax-like*) foram analisados por ELISA. Foram administradas 3 doses da formulação com intervalo de 14 dias entre cada uma. A concentração do adjuvante Montanide ISA 720 foi na proporção de 7:3 adjuvante/proteína. Os grupos de camundongos foram imunizados com: (G1) Montanide ISA 720; (G2) NLP-CSP_{CT} (10μg/dose/mouse) + Montanide ISA 720 e (G3) NLP-CSP_R (10μg/dose/mouse) + Montanide ISA 720. Os resultados são expressos como os títulos da média aritmética de cada grupo em (log10 ± SEM), e foram comparados estatisticamente com teste ANOVA seguido pelo *Turkey test*. Diferenças significativas entre os grupos são indicadas nos gráficos: Onde ns (não significante) *P*> 0,05, ** *P*<0,01 e *** *P*<0,001.

Neste ensaio os títulos de anticorpos foram notavelmente altos, onde os valores já foram expressivos desde a primeira dose administradas. Após a terceira dose, o título de anticorpos atingiu aproximadamente Log $10x^6$. Para a maioria das comparações realizadas não houve diferença estatística, exceto para a variante yPvCSP-VK210 (P=0.0006) e yPvCSP-VK247 (P=0.0043), quando comparados os títulos de anticorpos entre as proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R, após a segunda dose. O experimento também foi realizado em dois ensaios independentes.

4.4.5. Determinação da longevidade dos anticorpos IgG em camundongos imunizados com as formulações contendo as proteínas, NLP-CSP_{CT} ou NLP-CSP_R, emulsionadas com o adjuvante Montanide ISA 720.

O ensaio de longevidade também foi realizado para este experimento como observado na figura 19.

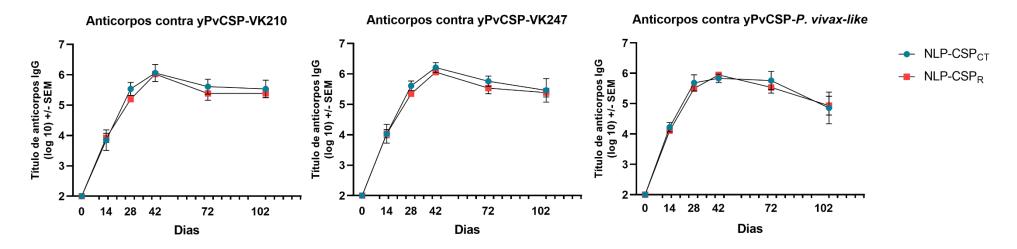


Figura 19. Avaliação da longevidade da resposta de anticorpos IgG em camundongos imunizados com as formulações contendo as proteínas, NLP-CSP_{CT} ou NLP-CSP_R na presença do adjuvante Montanide ISA 720. Camundongos foram imunizados com 3 doses no intervalo de 14 dias cada. A longevidade foi monitorada por 102 dias. Foram administradas 3 doses da formulação com intervalo de 14 dias entre cada uma. A concentração do adjuvante Montanide foi na proporção de 70:30 adjuvante/proteína. Os grupos de camundongos foram imunizados com: (G1) Montanide ISA 720; (G2) NLP-CSP_{CT} (10μg/dose/mouse) + Montanide ISA 720 e (G3) NLP-CSP_R (10μg/dose/mouse) + Montanide ISA 720.

50

Os resultados foram similares paras as variantes VK210 e VK247, mantendo o decaimento de maneira lenta e progressiva. Já a variante *P. vivax-like*, teve uma queda mais proeminente em relação as demais.

Apesar dos altos títulos de anticorpos contra todas as variantes alélicas da PvCSP, observamos duas potenciais implicâncias na utilização do Montanide ISA 720 para as próximas etapas deste estudo. A primeira é relacionada à questões farmacotécnicas, uma vez que o preparo da emulsão exige certa destreza, pois a fase oleosa precisa ser vigorosamente misturada com a fase aquosa, e após formulado a vacina precisa ser aplicada imediatamente, o que inviabilizaria a produção da vacina já emulsionada com o adjuvante. O segundo potencial impedimento, são as graves reações cutâneas observadas nos animais que receberam este adjuvante. Todos os camundongos apresentaram lesões severas, semelhantes a necrose, no local da injeção. Sem dúvidas, este é um agravante em sua aplicação para humanos.

A partir destas evidencias, as análises subsequentes deste trabalho foram direcionadas as proteínas formuladas com adjuvante Poly (I:C).

4.4.6. Avaliação da resposta de isotipos de IgG anti-NLP-CSP $_{\text{CT}}$ e anti-NLP-CSP $_{\text{R}}$

Os títulos das subclasses de IgG específicos para os alelos da PvCSP, foram mensurados entre os grupos no 14° dia após a terceira dose e a significância da resposta foi avaliada.

Estas informações são importantes e se fazem necessárias para que possamos elucidar o padrão de resposta gerada utilizando cada um dos antígenos. A resposta medida por células Th1 (Th, do inglês "*T helper*") estimula a ativação de células T citotóxicas e macrófagos, bem como estimulam a mudança de classe de anticorpos secretados por células B, sendo principal imunoglobulina a IgG2c. Já respostas mediadas por células Th2 estimulam uma potente proliferação de células B que geram anticorpos neutralizantes, sendo a IgG1 a principal subclasse produzida por esta célula.

Em relação a resposta humoral em camundongos, a razão IgG1/IgG2c<1 sugere uma resposta semelhante a Th1, enquanto a razão IgG1/IgG2c>1 representa uma resposta semelhante a Th2. Assim, a figura 20 nos mostra como cada antígeno estimulou o sistema imune baseado nas subclasses de IgG.

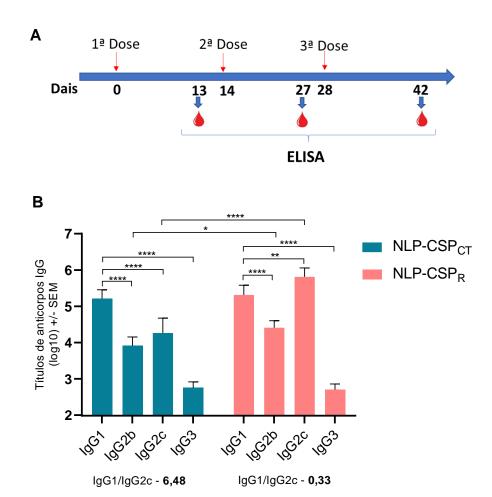


Figura 20. Análise das subclasses de anticorpos (IgG) em camundongos imunizados com a NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R. (A) camundongos C57BL/6 foram imunizados s.c. com três doses em intervalos de 14 dias entre cada dose com as NLPs (10ug / dose) na presença do adjuvante Poly (I:C), de acordo com o esquema apresentado. (B) As subclasses de anticorpos contra cada NLP foram analisadas e a razão IgG1/IgG2c foi destacada abaixo do gráfico. Todos os resultados são expressos como os títulos médios aritméticos de cada grupo em (log10 \pm SEM) e foram comparados estatisticamente usando One-Way ANOVA, seguida pelo Turkey test. As diferenças entre os grupos são indicadas no gráfico onde *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 e *****P<0.0001.

As respostas contra a proteína NLP-CSP_{CT} resultaram em maiores títulos de IgG1 do que de IgG2c (razão - 6.48 e P<0,0001), enquanto uma razão balanceada entre IgG1 e IgG2c foi encontrada para a NLP-CSP_R (razão - 0.33 e P=0.0040).

Ao comparar os títulos de anticorpos de uma mesma subclasse, mas em diferentes grupos, nós observamos um aumento significativo de IgG2b para o grupo

dos animais imunizados com a proteína NLP-CSP_R (*P*=0.0279) bem como de IgG2c (*P*<0.0001).

Em um modelo animal de infecção por *P. falciparum*, um candidato a vacina também induziu anticorpos anti-CSP do tipo IgG2 que estavam associados à proteção (SCHWENK; DEBOT; PORTER; NIKKI *et al.*, 2014). Por outro lado, a proteína NLP-CSP_{CT} apresentou padrão oposto, com predominância de IgG1. Assim, nossos dados sugerem que a presença da região C-terminal da PvCSP na proteína NLP-CSP_{CT} pode alterar o tipo de subclasses de resposta de anticorpos geradas, tendo como predominância a subclasse IgG1.

4.4.7. Determinação da especificidade de anticorpos anti-NLP-CSP_{CT} e anti-NLP-CSP_R.

O próximo passo para compreender melhor a resposta de anticorpos gerada pela imunização com as NLPs, foi avaliar contra quais regiões da proteína estavam sendo direcionados os anticorpos.

Para isso, realizamos o teste de ELISA, onde, cada uma das porções da sequência que constituem as proteínas quiméricas, foi utilizada como "coating" nas placas. Além disso, as proteínas homólogas (NLP-CSP_R e a NLP-CSP_{CT}) foram utilizadas para avaliar o título total de anticorpos, ou seja, a somatória de todas as respostas.

Assim sendo, empregamos cada uma das variantes alélicas da proteína PvCSP (FliC's) VK210, VK247 e *P. vivax-like* (LEAL; CAMACHO; TEIXEIRA; BARGIERI *et al.*, 2013), também a proteína contendo apenas as regiões conservadas, N- e C-terminal, da PvCSP (Pv-No repeat) (TEIXEIRA; TARARAM; LASARO; CAMACHO *et al.*, 2014) além da nucleocapsídeo do vírus da caxumba, como mostra a Figura 21.

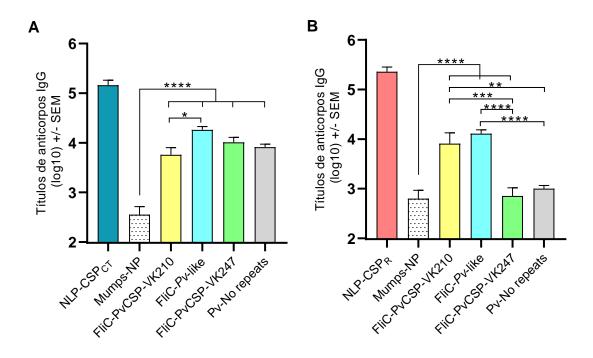


Figura 21. Resposta específica de anticorpos (IgG) em camundongos imunizados com a NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R. Grupos de 6 camundongos C57BL/6 foram imunizados s.c. com três doses em intervalos de 14 dias entre cada dose com as NLPs (10ug/dose) na presença do adjuvante Poly (I: C), de acordo com o esquema apresentado anteriormente. As figuras (A) e (B), representam os grupos imunizados com NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R respectivamente e mostram o reconhecimento especifico das repetições centrais das três variantes alélicas (repetições FliC-PvCSP) pelos anticorpos, bem como a região N-C terminal (*No repeats*), além também da porção viral (Caxumba-NP). Todos os resultados são expressos como os títulos médios aritméticos de cada grupo em (log10 ± SEM) e foram comparados estatisticamente usando One-Way ANOVA, seguida pelo Turkey test. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 e *****P*<0.0001.

Altos títulos de anticorpos foram mensurados contra as proteínas homólogas (maiores que 10x⁵) e cada uma das variantes alélicas, nos dois grupos (maiores que 10x⁴), exceto para os camundongos vacinados com a NLP-CSP_R, aos quais os títulos de anticorpos para variante VK247 foram significativamente menores em comparação com outras variantes, *P. vivax*-like (*P*<0.0001) e VK210 (*P*=0.0001). O soro dos camundongos vacinados com a NLP-CSP_{CT} apresentou títulos de anticorpos para a variante *P. vivax-like* significativamente maiores quando comparados com a variante VK210 (*P*=0.0395), mas não significante quando comparado com a variante VK247 (*P*=0.6255). Vale ressaltar que, como já se esperava, há altos títulos de anticorpos também contra as regiões conservadas (Pv-No *repeats*), nos animais imunizados com a NLP-CSP_{CT} (aproximadamente 10x⁴). Os camundongos imunizados com a proteína NLP-CSP_R apresentaram baixos títulos de anticorpos, como previsto, para a proteína Pv-*No repeats* (10x³) pois, apesar da

construção contemplar 6 aminoácidos que pertencem a região RI (N-terminal), ela não possui a região RII (C-terminal).

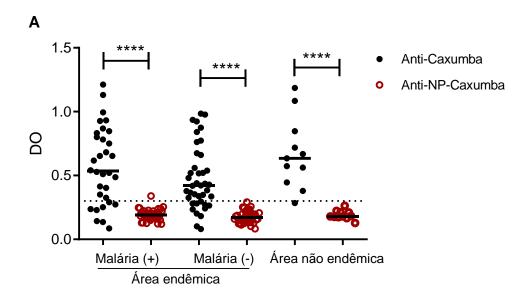
Os títulos de anticorpos contra a proteína do nucleocapsídeo do vírus da caxumba foram significativamente menores em comparação com praticamente todas as variantes em ambos os grupos, exceto para VK247 do grupo imunizado com a NLP-CSP_R (*P*= 0.9998).

Esses achados nos levaram a conclusão que ambas as formulações vacinais induzem baixa resposta contra a proteína NP do vírus da caxumba, porém, apenas a formulação contendo NLP-CSP_{CT} induziu altos títulos de anticorpos para todos os domínios da PvCSP, tanto para as porções variantes quanto para as porções conservadas.

Baseados nesses achados, nós consideramos que somente a formulação NLP-CSP_{CT} em combinação como o adjuvante Poly (I:C) é a melhor candidata para seguir adiante nos demais ensaios.

4.4.8. Soroprevalência dos anticorpos específicos contra o vírus da caxumba e proteína NP em residentes de áreas endêmicas e não-endêmicas para malária.

Considerando a presença de um componente viral antigênico do vírus da caxumba nas formulações aqui propostas, essa análise foi necessária para elucidar a seguinte questão: Qualquer memória imunológica contra o vírus da caxumba na população em geral (gerado pela vacina ou pela exposição natural) poderia interferir com a resposta imune contra as PvCSP, como demonstrado para outras formulações (SEKALY, 2008). Portanto, medimos os anticorpos séricos específicos para o vírus da caxumba e sua NP, em indivíduos de áreas endêmicas e não-endêmicas para malária (Figura 22A) utilizando kit comercial de ELISA e também comparando no mesmo cenário a resposta de anticorpos contra a proteína NLP-CSPct e a proteína NP somente (Figura 22B).



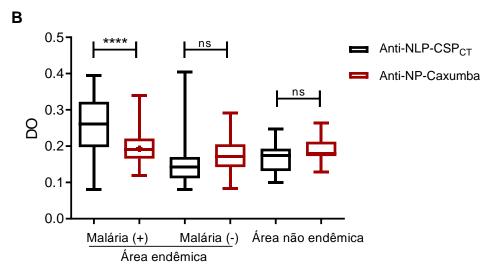


Figura 22. Comparação da resposta de anticorpos contra proteínas do vírus da caxumba e antígeno vacinal NLP-CSP_{CT}. (A) A sorologia de indivíduos infectados por *P. vivax* no memento da coleta (n = 40), indivíduos que vivem em área endêmica porem não infectados por *P. vivax* no mento da coleta (n = 40) e indivíduos imunizados ou que já tiveram caxumba em área não endêmica para *P. vivax* (n = 12) foi investigada usando um kit comercial ELISA. A linha tracejada no gráfico indica o limite mínimo (DO₄₉₂ = 0,3) para considerar um indivíduo imunizado contra o vírus da caxumba, conforme indicado no manual do fornecedor. (B) Os mesmos soros foram testados novamente por ELISA contra a proteína NP e contra o antígeno vacinal NLP-CSP_{CT}. Todos os resultados são expressos como DO₄₉₂ (densidade ótica) e foram comparados estatisticamente usando One-Way ANOVA, seguida pelo Turkey test, onde *****P<0.0001 e ns (não significante) *P*>0,05.

Embora a maioria dos indivíduos tenha testado positivo para caxumba, demonstrando que a grande parte deles já foram expostos ou vacinados contra o vírus, eles eram negativos para a proteína NP (*P*<0.0001), independentemente da área de origem ou qualquer pré-exposição à malária. Assim este resultado está de

acordo com a baixa soroprevalência de anticorpos específicos para a NP do vírus da caxumba relatados anteriormente (ALLWINN; ZEIDLER; STEINHAGEN; ROHWADER et al., 2011).

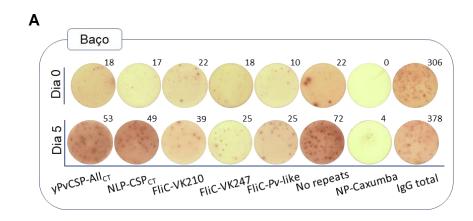
Um outro dado relevante, é que os soros de pacientes positivos para malária no momento da coleta mostraram uma diferença significativa quando testados contra a proteína NLP-CSP ou contra a proteína NP (*P*<0.0001). Este dado indica que nosso antígeno vacinal é reconhecido por anticorpos de indivíduos que foram expostos ao *P. vivax*, não havendo diferença significativa em soros obtidos de indivíduos de área não endêmica. Com isso concluímos que a proteína NP não gera altos títulos de anticorpos específicos, não interferindo no reconhecimento das sequencias representantes da PvCSP.

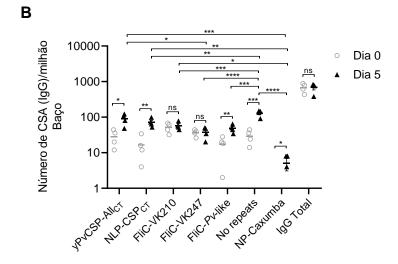
4.4.9. Detecção de células secretoras de anticorpos específicas para NLP-CSPc⊤ no baço e medula óssea de camundongos imunizados.

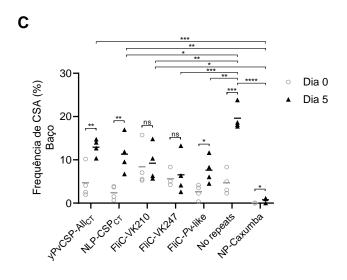
Uma vez que observamos altos títulos de anticorpos contra todas as variantes alélicas da proteína PvCSP em camundongos imunizados com NLP-CSP_{CT}, seguimos para o teste de ELISPOT, a fim de determinar a geração de células secretores da anticorpos específicas (CSA) contra cada uma das porções da proteína NLP-CSP_{CT}, sejam no baço ou na medula óssea, de camundongos imunizados no mesmo esquema que em experimentos anteriores.

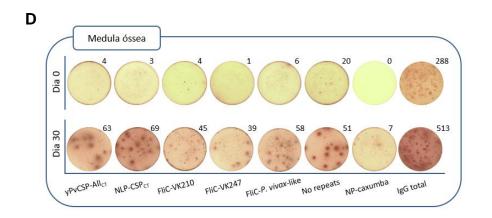
Para a análise das CSA no baço, grupos de camundongos foram eutanasiados nos dias 0 e 5 após a terceira dose, já que os esplenócitos tiveram seu pico de frequência de CSA medida 5 dias após o Segundo *boost,* (SILVEIRA; KASTURI; KOVALENKOV; RASHEED *et al.*, 2015), já para a coleta das células da medula, outros grupos de camundongos foram eutanasiados nos dias 0 e 30, respectivamente.

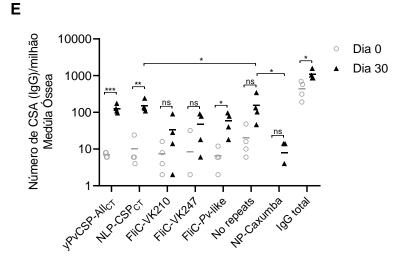
Os ensaios de ELISPOT foram dirigidos contra duas proteínas quiméricas, a PvCSP-AllcT e NLP-CSPcT, e também avaliados contra cada um dos três alelos, além das as regiões conservadas da PvCSP, e por fim, contra a proteína NP do vírus da caxumba, bem como o total de células secretoras e IgG, como mostra a figura 23.











F

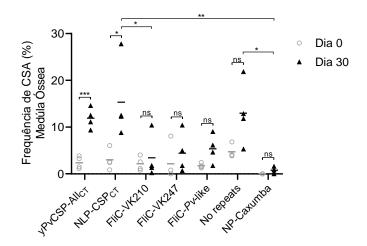


Figura 23. Resposta das células secretoras de anticorpos (CSA) em camundongos imunizados com NLP-CSPcT. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com três doses de NLP-CSP_{CT} conjugado com o adjuvante Poly (I: C). A resposta de CSA específica ao antígeno no baço foi medida nos dias 0 e 5, e na medula óssea nos dias 0 e 30 após a última dose. Um exemplo representativo da resposta CSA específica para yPvCSP-AllcT, NLP-CSPcT, FliC-VK210, FliC-VK247 e FliC-P. vivax-like no baco é mostrado na figura (A), enquanto o da medula óssea é mostrado em (D). Os poços mostrados nas respectivas figuras foram plaqueados com 0,5x105 células. As CSA totais foram medidas para células secretoras de IgG específicas contra as proteínas acima mencionadas. Os símbolos nos gráficos representam as contagens CSA médias observadas por milhão de células, enquanto as barras representam o erro padrão da média ±SEM (B e E) e a frequência (C e F). Os resultados foram comparados estatisticamente aplicando one-way ANOVA seguido pelo Tukey's test. As diferenças significativas entre os grupos são denotadas no gráfico: *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 e ****P<0,0001. Diferencas não significativas (ns) são indicadas (P>0,05). O experimento foi realizado duas vezes com 4 camundongos por grupo.

As figuras 23A e 23D são representativas das leituras dos poços da placa de ELISPOT onde é possível observar a representação visual do número de *spots* em cada poço.

Em comparação ao dia 0, um aumento significativo do número de CSA específicas para os repeats da variante P. vivax-like (P=0.0097), para as porções conservadas da PvCSP (Pv-No repeats) (P=0.0401), yPvCSP-AllcT (P=0.0139), NLP-CSP_{CT} (P=0.0032) e NP do vírus da caxumba (P=0.0006) foi observado no baço dos animais imunizados (Figura 23B). Entretanto, o número de CSA específicas para as variantes VK210 e VK247 não foi significativamente alterada em comparação no dia 0 e no dia 5, assim como a frequência do total de células secretoras de IgG. Em contraste, células da medula óssea foram testadas para frequência de CSA, 30 dias após o segundo reforço, pois essas células necessitam de mais tempo para migrar para esse local (KASTURI; KOZLOWSKI; NAKAYA; BURGER et al., 2017). Uma frequência aumentada de CSA específicas para as duas proteínas quiméricas PvCSP-Allct e NLP-CSPct foi encontrada na medula óssea (Figura 23E). Apesar da terceira dose ter aumentado a resposta geral para as duas proteínas quiméricas yPvCSP-AllcT (P=0.0004) e NLP-CSPcT (P=0.0031), para a variante P. vivax-like (P=0.0278) e IgG total (P=0.0207), nenhum aumento na expressão foi observado para as outras regiões da proteína PvCSP analisadas (VK210, VK247, Pv-No repeats) e proteína NP. A resposta não-específica (total de células secretoras de IgG) foi, como esperado, a mesma em ambos os órgãos, independentemente do tempo após o estímulo. A resposta específica para PvCSP representam cerca de 10% do total de CSA no baço e na medula óssea nos dias 5 e 30 após o estímulo, respectivamente (Figura 23C e F).

Portanto, os dados obtidos por ELISPOT se correlacionam com os altos títulos de anticorpos dos soros desses camundongos observados no teste de ELISA. A magnitude dos títulos de anticorpos presentes no soro foram os mesmos dos anticorpos secretados por CSA de longa duração presentes na medula óssea e de CSA recém-formadas (brevemente presentes na recirculação e em órgãos linfoides secundários onde são formados, bem como em tecidos inflamados enquanto estes permanecerem inflamados). Como a imunização com NLP-CSPcT induz altos títulos de anticorpos contra todas as regiões variáveis e conservadas da proteína PvCSP, isso pode representar grande quantidade de CSA geradas após a primeira e

segunda doses que atingiram a medula óssea. Algumas das CSA parecem terem sido formadas após a terceira dose, refletido no aumento o número de CSA contra algumas porções da proteína observadas no baço 5 dias após a terceira imunização e nos títulos de anticorpos contra *P. vivax-like*, assim como no aumento do número de CSA na medula óssea 30 dias após a terceira imunização, para todas as porções da proteína presente na vacina.

4.4.10. Avaliação da eficácia da vacina

Uma das formas mais eficazes de analisar a eficácia de uma vacina e através de um teste de desafio. Essa abordagem já foi utilizada anteriormente e mostrou ser efetiva na demonstração de proteção induzida por vacinação (DE CAMARGO; DE FREITAS; GIMENEZ; LIMA et al., 2018; GIMENEZ; LIMA; FRANCOSO; DENAPOLI et al., 2017). Entretanto, *P. vivax* não infecta roedores. Considerando que o *P. berghei* é um parasito que infecta murinos, utilizamos o parasito quimérico Pb/PvVK210, no qual os *repeats* da proteína PbCSP foram substituídos pela PvCSP (VK210), como descrito anteriormente (ESPINOSA; YADAVA; ANGOV; MAURIZIO et al., 2013).

Os grupos de camundongos foram imunizados 3 vezes com a proteína NLP-CSP_{CT} mais o adjuvante Poly (I:C), ou apenas com o adjuvante. Trinta dias após a terceira dose, os camundongos foram desafiados com 5.000 esporozoítos Pb/PvVK210 (Figura 24A) e após o 4º dia do desafio, amostras de sangue foram diariamente coletadas e analisadas por citometria de fluxo acompanhando a evolução da parasitemia (Figura 24B)

Foram confirmadas a proteção estéril de 2 dos 7 camundongos até o décimo dia após o desafio, enquanto que todos os animais do grupo controle estavam infectados no quarto dia após o desafio, atingindo 1% de parasitemia no 6º dia (Figura 24C). Além da proteção estéril parcial, onde a diferença foi estatisticamente significativa entre os grupos (*P*=0.0012) a parasitemia foi cerca de 10 vezes menor, já excluindo os animais protegidos, no grupo imunizado com a combinação NLP-CSP_{CT} + Poly (I:C), em comparação com o grupo controle (Figura 24D, *P*=0.0051).

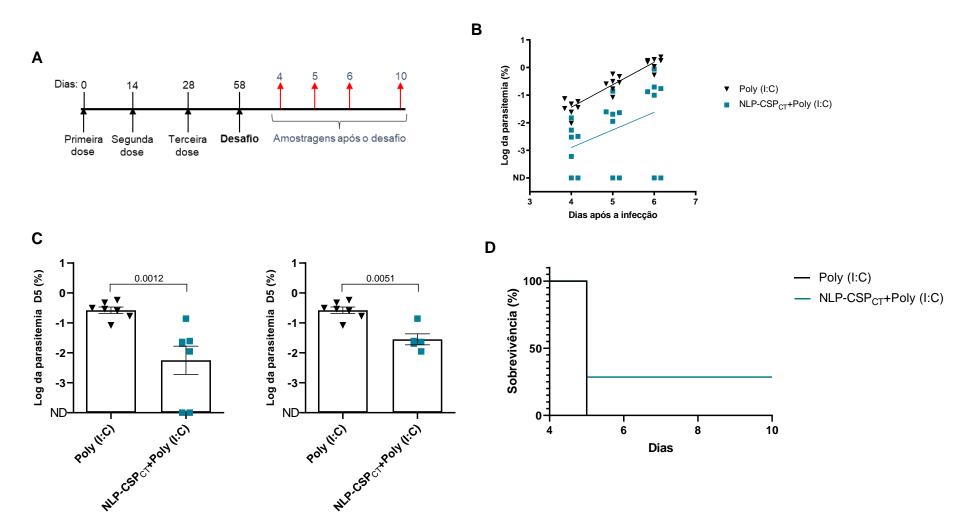


Figura 24. Avaliação da parasitemia após a imunização de camundongos imunizados com a proteína NLP-CSP_{CT} e desafiados utilizando *P. berghei* transgênico. (A) camundongos C57BL/6 foram imunizados s.c. com Poly (I:C) ou uma mistura de Poly (I:C) e 10μg de proteína recombinante NLP-CSP_{CT} seguindo o esquema descrito. No dia 58 após a iniciação, os camundongos foram desafiados com 5.000 esporozoítos transgênicos Pb/PvVK210. (B) A parasitemia foi analisada por citometria de fluxo e a porcentagem de glóbulos vermelhos infectados (IRBCs) nos dias 4, 5 e 6 após a infecção (p.i.) foi transformada em log para normalização da parasitemia antes da análise estatística. (C) O log da parasitemia no dia 5 (D5) pós-desafio foi medido em camundongos de cada grupo imunizado. A significância foi determinada pelo teste t não pareado bicaudal (teste de Mann-Whitney). (D) Curva de sobrevivência com a porcentagem de camundongos não infectados em cada grupo.

5. DISCUSSÃO

É indiscutível de que a malária ainda é um grave problema de saúde pública que afeta milhares de vidas ao redor do mundo. Apesar dos inúmeros esforços no combate contra esta doença, o número de óbitos ainda é elevado, chegando a mais de 405 mil mortes por ano (WHO, 2019).

Os investimentos mais expressivos são direcionados para o combate do *P. falciparum*, que afeta principalmente a região da África subsaariana, o que acarreta muitas vezes a negligencia para outras espécies de *Plasmodium*, que são consideradas menos graves (WHO, 2019). Dentre as estratégias de prevenção, o desenvolvimento de vacinas é notoriamente o que traz melhor custo/benefício.

Formulações vacinais que visem bloquear a infecção pelos esporozoítos são uma das estratégias com maiores chances de sucesso, isso porque é durante esta fase do ciclo na qual há um dos menores números de parasitas (GRAUMANS; JACOBS; BOUSEMA; SINNIS, 2020). Estima-se que na maioria das picadas dos mosquitos são inoculados cerca de 8 a 40 esporozoítos, sendo assim, anticorpos contra esta forma do parasito tem maior chance de impedir a progressão do ciclo, enquanto que no estágio sanguíneo existem dezenas de milhares de parasitos circulantes, sendo mais difícil sua eliminação (GRAUMANS; JACOBS; BOUSEMA; SINNIS, 2020). Outro ponto de extrema importância é que essas formulações podem contribuir para a diminuição dos casos de recaídas, pois impediria a infecção dos hepatócitos e formação de novos hipnozoítos no fígado, reforçando a importância de se desenvolver vacinas com foco nesta fase do ciclo (WHITE; AMINO; MUELLER, 2017).

No que se refere ao uso de VLPs como sistema de entrega de antígenos, o mesmo já se mostrou uma boa estratégia no desenvolvimento de vacinas eficientes. Este sistema baseia-se na utilização de proteínas de superfície dos mais diversos tipos de vírus. Alguns casos bem sucedidos de vacinas baseadas em VLP são formulações contra o Papilomavírus Humano (HPV), assim como Cervarix®, Gardasil® e Gardasil9®, e a vacina contra o vírus da Hepatite B (HBV) (MOHSEN; ZHA; CABRAL-MIRANDA; BACHMANN, 2017).

Em relação a vacina contra malária, a vacina RTS,S, estruturada em forma de VLP carreando a proteína CS de *P. falciparum* como antígeno, conseguiu a

aprovação nos ensaios clínico de fase III e atualmente encontra-se em um projeto de implementação piloto em três países na África (ADEPOJU, 2019).

Todavia, o emprego de VLPs deve ser considerado com cautela, uma vez que em análise comparativa realizada entre duas formulações vacinais semelhantes contendo a proteína CS, uma na forma de antígeno solúvel e outra na forma de VLP, mostrou que esta última, apesar de apresentar uma alta resposta específica para o antígeno, títulos significativamente altos foram detectados também contra componente viral (VANLOUBBEECK; PICHYANGKUL; BAYAT; YONGVANITCHIT et al., 2013).

A necessidade de desenvolvimento de novas estratégias para melhorar a eficácia de uma vacina contra P. vivax levou nosso grupo a exploração da nucleocapsídeo do vírus da caxumba (NP) como sistema de entrega de antígeno, sendo assim, diferentemente da estratégia empregada no desenvolvimento da RTS,S, não utilizamos uma proteina de superficie, então, aos invés de gerar uma "Virus Like Particle", temos o que chamamos de "Nucleo Like Particle" (NLP) (KINGSTON; BAASE; GAY, 2004). Esse carreador foi selecionado após levarmos em conta dois fatos: a proteína NP é fracamente reconhecida mesmo em indivíduos vacinados contra caxumba (ALLWINN; ZEIDLER; STEINHAGEN; ROHWADER et al., 2011), e a utilização da levedura P. pastoris, uma vez que este sistema de expressão já havia sido explorado com sucesso para a produção de NLPs (SLIBINSKAS; ZVIRBLIENE; GEDVILAITE; SAMUEL et al., 2003). O emprego da levedura Pichia pastoris já é amplamente descrito como um dos mais eficientes sistemas para a produção de proteínas recombinantes, gerando proteínas com alto grau de pureza e ótimo rendimento (GIMENEZ; FRANCOSO; ERSCHING; ICIMOTO et al., 2016; VICENTIN; FRANCOSO; ROCHA; IOURTOV et al., 2014; WANG; JIANG; WANG, 2016) além da capacidade de expressar partículas virais na forma de NLPs e VLPs (SARASWAT; ATHMARAM; PARIDA; AGARWAL et al., 2016; SHUKLA; RAJPOOT; ARORA; PODDAR et al., 2017)

Previamente, nós mostramos que a proteína PvCSP expressa em *P. pastoris* possui alta imunogenicidade, provocando a geração de anticorpos capazes de reconhecer esporozoítos de *P. vivax* e conferir proteção moderada contra teste de desafio (GIMENEZ; LIMA; FRANCOSO; DENAPOLI *et al.*, 2017).

Analisando as variáveis apresentadas e, com o objetivo de aumentar a resposta imunológica contra a proteína CS, clonamos, purificamos e caracterizamos com sucesso duas NLPs carregando a sequência da proteína PvCSP. As formulações permaneceram estáveis e apresentaram a conformação estrutural apropriada, evidenciado pelo diâmetro médio da partícula que corresponde ao nucleocapsídeo do vírus da caxumba, que foi confirmado após ensaio de microscopia eletrônica de varredura (SLIBINSKAS; ZVIRBLIENE; GEDVILAITE; SAMUEL et al., 2003). Em termos de comparação com a VMP001, que é a vacina contra P. vivax em estágio mais avançado de estudos, a ausência da região Nterminal da proteína PvCSP, que contêm epítopos para células TCD4, na nossa formulação pode apresentar uma vantagem adicional se comparada a VMP001, uma vez que a resposta de células TCD4+ foi direcionada a região N-terminal em 90% dos indivíduos vacinados com esta vacina; tal resposta não foi protetora contra a (BENNETT; infecção controlada de malária humana YADAVA: TOSH: SATTABONGKOT et al., 2016).

Nossas duas formulações também induziram altos títulos de anticorpos detectados em soros de camundongos 14 dias após a terceira dose, mostrando magnitude e longevidade de resposta satisfatórios, além de produzirem fortes respostas de anticorpos contra todas as 3 regiões repetidas de PvCSP, e uma resposta ainda maior contra a variante *P. vivax*-like. Este padrão de resposta corrobora com o observado em trabalhos anteriores (TEIXEIRA; TARARAM; LASARO; CAMACHO *et al.*, 2014), demonstrando que a geração de anticorpos específicos contra as regiões repetidas da PvCSP não foi afetada pela presença da sequência viral.

Em relação aos adjuvantes empregados nos protocolos de imunizações, o Montanide ISA 720 que tem sido empregado em testes pré-clínicos (AREVALO-HERRERA; VERA; CASTELLANOS; CESPEDES et al., 2011) e clínicos de fase I e voluntários sadios, havendo relatos de reações cutâneas que variam de moderadas a severas (HU; CHEN; GU; WAN et al., 2008; MCCARTHY; MARJASON; ELLIOTT; FAHEY et al., 2011; ROESTENBERG; REMARQUE; DE JONGE; HERMSEN et al., 2008). Durante a execução de nossos experimentos, também observamos reações cutâneas nos animais vacinados, fato este que resultaram na descontinuidade dos testes com este adjuvante. O Poly (I:C) ativa diferentes receptores de

reconhecimento de padrões, como TLR3, RIG-I/MDA5 e PKR, desencadeando várias vias inflamatórias, incluindo NF-kB e IRF (YAMAMOTO; SATO; HEMMI; HOSHINO et al., 2003; YU; LEVINE, 2011) provocando uma resposta inflamatória do tipo Th1 tanto em camundongos quanto em humanos e, assim, foi levantada a hipótese de que essa resposta poderia contribuir para a proteção (PEREZ-MAZLIAH; LANGHORNE, 2014). Em trabalhos previamente publicados pelo nosso grupo, mostramos que Poly (I:C) era responsável por aumentar não apenas a imunogenicidade das proteínas recombinantes de PvCSP após a vacinação (LEAL; CAMACHO; TEIXEIRA; BARGIERI et al., 2013; TEIXEIRA; TARARAM; LASARO; CAMACHO et al., 2014), mas também a proteção após desafio com parasitos transgênicos (DE CAMARGO; DE FREITAS; GIMENEZ; LIMA et al., 2018; GIMENEZ; LIMA; FRANCOSO; DENAPOLI et al., 2017).

No que tange às respostas humorais em camundongos, a razão IgG1/IgG2c <1 sugere uma resposta semelhante a Th1, enquanto a razão IgG1/IgG2c > 1 representa uma resposta semelhante a Th2. Nossos resultados mostram que a formulação da vacina contendo a NLP-CSP_R induziu uma predominância de IgG2c sobre IgG1. Em modelo animal de infecção por *P. falciparum*, avaliado por Schwen e colaboradores, um candidato a vacina também induziu anticorpos anti-CSP do tipo IgG2 e que foram associados à proteção (SCHWENK; DEBOT; PORTER; NIKKI et al., 2014). Por outro lado, a proteína NLP-CSP_{CT} apresentou padrão oposto, com predominância de IgG1. Assim, nossos dados sugerem que a presença da região Cterminal da PvCSP na proteína NLP-CSP_{CT} pode alterar a conformação do antígeno, destacando outros epítopos relacionados à resposta de IgG2, onde, apesar de ocorrer a predominância de anticorpos IgG1, houve uma proteção com menor parasitemia e maior sobrevida de camundongos imunizados e desafiados. Porém, uma questão que deve ser levada em consideração, é que permanece a dúvida se uma formulação com respostas tão específicas em camundongos, pode apresentar um padrão semelhante em humanos e ainda ser protetora.

Os altos níveis de anticorpos presentes no soro dos camundongos são resultantes do aumento do número de CSA (Células Secretoras de Anticorpos) específicas no baço dos animais 5 dias após a segunda dose. A maioria das CSA geradas após a primeira e segunda doses da vacina devem ter alcançado a medula óssea no dia 0 após a terceira dose, indicando que o nível "basal" de CSA

específicas pode já estar alto. Em nossa formulação vacinal, uma vez que todas as 3 variantes das regiões não conservadas da PvCSP estavam presentes na mesma proteína quimérica e na mesma proporção molecular, diferenças na cinética de CSA específicas para P. vivax-like e No-repeats não eram esperadas. Apesar de os mecanismos envolvidos nessa resposta não estarem dentro do escopo desse projeto, algumas das hipóteses a seguir podem ser levadas em consideração: (i) Algumas regiões da proteína, em sua estrutura terciária, podem estar mais disponíveis para a ligação de anticorpos do que outras, o que pode conferir uma vantagem para ativação de células B. Esta característica das células B é uma das mais importantes e é extensivamente estudada para antígenos como a hemaglutinina (HA) do vírus Influenza e a proteína gp120 do vírus HIV (ANGELETTI; GIBBS; ANGEL; KOSIK et al., 2017; ANGELETTI; KOSIK; SANTOS; YEWDELL et al., 2019); (ii) Além disso, o reconhecimento de alguns epítopos pode interferir com a disponibilidade de anticorpos que se ligam a outros epítopos. Apesar de esse ser um fenômeno raro, ele já foi documentado na imunidade de anticorpos contra PfCSP em pacientes infectados (KISALU; IDRIS; WEIDLE; FLORES-GARCIA et al., 2018).

Desconsiderando os mecanismos envolvidos, é inegável que a terceira imunização provocou a formação de maior número de CSA para as regiões conservadas da proteína PvCSP e para a variante P. vivax-like. Nem todas as CSA formadas até esse ponto vão contribuir para a imunidade a longo prazo geralmente observada na medula óssea, mas algumas vão e podem ser detectadas quando a resposta geral é analisada (CSA específica para PvCSP-Allct e NLP-CSPct). Esse aumento na resposta geral a longo prazo indica a necessidade de uma terceira dose e que pode refletir na eficácia da vacina. É interessante notar que a mesma resposta de CSA é observada contra PvCSP-All_{CT} e NLP-CSP_{CT}.Esse resultado reafirma o observado com o padrão de anticorpos, indicando que a fusão da NP em relação à construção quimérica da proteína CSP não afetou o reconhecimento dos epítopos de PvCSP. Além disso, quando os diferentes componentes da proteína são analisados individualmente, nenhum aumento no número de CSA específicas para esses componentes, na medula óssea, 30 dias após a terceira dose, foi observado. Isso sugere que a imunidade a longo prazo eficiente já foi formada pela primeira e segunda imunizações (impressão sorológica). Consequentemente, a terceira imunização parece melhorar a imunidade de longo prazo já existente, sendo de

particular importância para o reforço da imunidade necessária para atingir células de memória que contribuem para a proteção geral, como visto para a vacina contra Influenza (LEE; PAPARODITIS; HORTON; FRUHWIRTH *et al.*, 2019).

Um dos maiores embates enfrentados pelos grupos de pesquisa que desenvolvem vacinas contra *P. vivax* é superar os próprios obstáculos relacionados à biologia do parasito, sendo um fator que impacta significativamente no sucesso do desenvolvimento de novas vacinas. Isso porque, o isolamento e identificação de subespécies e, posteriormente, o cultivo do parasito em cultura celular são os principais desafios *in vitro* (NOULIN; BORLON; VAN DEN ABBEELE; D'ALESSANDRO *et al.*, 2013; UDOMSANGPETCH; KANEKO; CHOTIVANICH; SATTABONGKOT, 2008).

Dessa forma, a estratégia que tem permitido estudar potenciais vacinas contra malária *vivax* baseia-se na utilização de parasitos transgênicos, que expressam proteínas envolvidas no ciclo do *P. vivax* (OTHMAN; MARIN-MOGOLLON; SALMAN; FRANKE-FAYARD *et al.*, 2017). A utilização do *P. berghei* se mostrou uma estratégia interessante, onde Espinosa e colaboradores (2013), através de técnicas moleculares, fizeram a substituição da região central da proteína CS de *P. berghei* pela região central (variante VK210) de *P. vivax* para uso em ensaios de desafio experimental (ESPINOSA; YADAVA; ANGOV; MAURIZIO *et al.*, 2013). Estes parasitos quiméricos vêm sendo aplicados como uma alternativa em estudos pré-clínicos de novas vacinas.

Nos testes de desafio empregando parasitas transgênicos, nossa formulação foi capaz de conferir proteção estéril em aproximadamente 30% dos animais imunizados e desafiados, além de gerar uma queda significante (de aproximadamente 10 vezes) na parasitemia de animais não protegidos de forma estéril.

No caso de vacinas contra a malária em desenvolvimento, foi demonstrado ao longo dos anos que as respostas imunes, especialmente de anticorpos, precisam de quantidade e qualidade para fornecer proteção. Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que títulos de IgG anti-PvCSP acima de 10⁴, obtidos através da imunização, poderiam fornecer proteção parcial em modelos de malária murina (DE CAMARGO; DE FREITAS; GIMENEZ; LIMA *et al.*, 2018; GIMENEZ; LIMA; FRANCOSO; DENAPOLI *et al.*, 2017). Em nosso trabalho, ambas as formulações

desencadearam títulos de IgG semelhantes entre si, sendo superiores a 10⁵. No entanto, a amplitude dos epítopos PvCSP reconhecidos (repetições centrais ou região C-terminal) foi maior, dependendo da formulação usada.

Em uma breve comparação com nossos resultados anteriores (GIMENEZ; LIMA; FRANCOSO; DENAPOLI et al., 2017), apesar da metodologia utilizada para determinar a proteção ser a mesma, existem diferenças em alguns pontos. Para utilizar uma rota de imunização mais adequada para a comparação com futuros resultados de vacinação em humanos, a via intraperitoneal usada por Gimenez et al. foi modificada pela via subcutânea nesse projeto. Também as condições do desafio foram reforçadas, onde ao invés de utilizarmos a inoculação de 4.000 esporozoítos por animal, utilizamos 5.000, além da avaliação da parasitemia, onde substituímos a metodologia de leitura, antes realizada por esfregaço, para a leitura utilizando citometria de fluxo, que é um método mais sensível e preciso. Por essas razões, consideramos que a proteção estéril observada neste estudo é, pelo menos, equivalente com os resultados anteriores. A respeito de outras formulações que são capazes de conferir um alto nível de proteção em modelos murinos, como Rv21 (SALMAN; MONTOYA-DIAZ; WEST; LALL et al., 2017), a comparação é ainda mais difícil: não apenas a via de administração é diferente (i.m versus s.c), mas também a construção do parasito transgênico foi realizada utilizando abordagens diferentes (ESPINOSA; YADAVA; ANGOV; MAURIZIO et al., 2013; SALMAN; MONTOYA-DIAZ; WEST; LALL et al., 2017), e o sistema de desafio variou de i.v. para i.d., respectivamente.

Nos casos de malária causada pelo *P. vivax*, um fator complicador na patologia da doença, é a presença da forma latente do parasito, o hipnozoíto, que é responsável pelas recaídas da doença. A respeito disso, a diminuição da parasitemia em 10 vezes vai além do que se é visto, já que alguns dos esporozoítos que não foram capazes de alcançar o fígado dariam origem aos hipnozoítos. Portanto, a vacinação que confere "apenas" uma proteção parcial, hipoteticamente também contribui para a diminuição do número de recaídas (WHITE; AMINO; MUELLER, 2017). Por outro lado, não foi possível testar essa possibilidade de produção de hipnozoítas após o desafio parasitário, pois o parasito transgênico Pb/Pv ainda é biologicamente *P. berghei*, espécie esta que não gera hipnozoítos em camundongos.

O número de esporozoítos usados no modelo de infecção e o uso de parasitos transgênicos (Pb/Pv) são dois outros pontos a serem considerados. Para o teste de desafio, 5.000 SPZs foram usados, o que é um número muito alto se comparado com a infecção natural pela picada do mosquito, na qual em um indivíduo é inoculado com menos de 40 SPZs (ROSENBERG; WIRTZ; SCHNEIDER; BURGE, 1990). Apesar de parasitos transgênicos causadores da malária serem ferramentas importantes para a elucidação da eficácia de vacinas, seu uso pode produzir resultados que subestimam a eficácia das mesmas, as limitações na diversidade de antígenos expressos dificulta a real avaliação da proteção, já que não é possível realizar a substituição total da proteína CS, além do P. berghei, como dito anteriormente, não gerar hipnozoítos (GALINSKI; BARNWELL, 2008; OTHMAN; MARIN-MOGOLLON; SALMAN; FRANKE-FAYARD et al., 2017). Assim, este parasito transgênico é construído pela substituição apenas da região dos *repeat*s da proteína CS do P. berghei com os aminoácidos correspondentes da variante VK210 de P. vivax (ESPINOSA; YADAVA; ANGOV; MAURIZIO et al., 2013). Contudo, a formulação vacinal desse estudo gerou anticorpos contra as variantes VK210, VK247, e P. vivax-like, e as regiões RI e C-terminal. O teste de desafio indica apenas a eficácia protetora dos anticorpos direcionados para a variante VK210, portanto, a eficácia das formulações desenvolvidas nesse estudo pode ser ainda maior quando considerada no caso de infecção natural.

Os dados obtidos nesse estudo demonstram que nossa formulação se apresenta como uma boa candidata universal contra *P. vivax* e dão subsídios pra posteriores testes pré-clínicos, onde a segurança da formulação será avaliada.

Como encerramento deste trabalho, trazemos uma reflexão acerca da importância em se prosseguir com o desenvolvimento de uma vacina contra *P. vivax*, já que a vacinação, como explanado neste trabalho, é a estratégia de prevenção com melhor custo-benefício, contribuindo substancialmente para a melhoria da qualidade de vida da população que vive em áreas endêmicas. Vale ressaltar que, apesar do *P. vivax* não ser a espécie que causa maior mortalidade, é a mais amplamente distribuída no mundo, onde as recorrentes infecções ou recaídas, devido à presença latente do parasito, afetam significativamente a vida dos que são infectados, sendo necessário repetir os longos tratamentos inúmeras vezes. Na vida das crianças a morbidade decorrente do processo de infecção afeta, inclusive, no

desenvolvimento da aprendizagem, decorrente dos inúmeros afastamentos das atividades escolares para tratamento.

Como apresentado anteriormente, o desenvolvimento de uma formulação eficaz contra malária é bastante complexa, levando anos para definir as melhores combinações de antígenos e adjuvantes. Por exemplo, só recentemente a primeira vacina contra *P. falciparum* entrou em fase implementação na África, após mais de 30 anos de pesquisa e, promovendo uma proteção de 30 a 40% dos pacientes. Embora nenhuma formulação já estudada promova completa proteção, há de se compreender que estes grupos de indivíduos protegidos, também deixariam de ser reservatórios do parasito, assim, além de não serem afetados pela doença, também diminuem a propagação da mesma. Este fenômeno, ao longo do tempo, impactaria significativamente no controle da doença, juntamente com as demais estratégias de controle e prevenção existentes.

Por último, infelizmente o desenvolvimento de uma vacina contra *P. vivax* é de baixo interesse para grandes indústrias do setor privado, principalmente por ser uma doença negligenciada, que afeta regiões carentes e com pouca estrutura de saúde. O papel das universidades públicas nesta temática é fundamental para suprir essa lacuna causada por este setor. Todavia, o acesso dos laboratórios de pesquisa às etapas subsequentes do desenvolvimento de uma vacina é bastante dispendioso, já que é necessário, após o ensaios pré-clínicos, iniciar um longo processo de estudos em humanos, sendo nessa etapa, que temos que contar com a colaboração das indústrias nacionais públicas, que podem assumir as etapas de testes clínicos por terem estrutura adequada para isto. Somente com essa união de forças é que realmente conseguiremos entregar para a sociedade o fruto de décadas de esforços e contribuir efetivamente para sanar o problema da malária em nosso país.

6. CONCLUSÕES

- 1. Duas novas proteínas quiméricas foram obtidas com alto grau de pureza, compostas pela sequência da proteína de nucleocapsídeo do vírus da caxumba fusionada com as diferentes variantes alélicas da PvCSP contendo, ou não, a região C-terminal.
- **2.** As proteínas NLP-CSP_{CT} e NLP-CSP_R tiveram sua caracterização biofísica realizada, onde, além de confirmar a pureza, também avaliamos a conformação da estrutura secundária por dicroísmo circular, além da estrutural, através microscopia eletrônica de transmissão, confirmando a formação de partículas semelhantes a nucleocapsídeos de ambas as proteínas.
- **3.** Em ensaios de imunização, ambas as formulações foram eficientes em induzir altos títulos de anticorpos IgG e uma elevada frequência de células secretoras de anticorpos contra as proteínas homólogas na presença do adjuvante Poly (I:C), porém, a proteína NLP-CSP_{CT} foi a melhor candidata no que tange a geração de anticorpos específicos contra as variantes alélicas da PvCSP individualmente.
- **4.** A utilização do nucleocapsídeo do vírus da caxumba não interferiu negativamente nas formulações analisadas, gerando baixos títulos de anticorpos contra a sequência viral nos camundongos imunizados. Ambas as proteínas também apresentaram baixo reconhecimento pelos soros de indivíduos que foram vacinados ou expostos ao vírus da caxumba.
- **5.** Em ensaios de desafio realizados no *Institut Pasteur*-Paris/França, a formulação vacinal contendo a proteína recombinante NLP-CSP_{CT} + Poly (I:C) foi capaz de promover a proteção estéril em cerca de 30% dos animais imunizados e desafiados com parasitos transgênicos Pb/Pv-VK210, além da redução da carga parasitária em cerca de 10x em animais não protegidos.

7. REFERÊNCIAS

ADEPOJU, P. RTS,S malaria vaccine pilots in three African countries. **Lancet**, 393, n. 10182, p. 1685, Apr 27 2019.

AGUIAR, A. C. C.; PANCIERA, M.; SIMAO DOS SANTOS, E. F.; SINGH, M. K. *et al.* Discovery of Marinoquinolines as Potent and Fast-Acting Plasmodium falciparum Inhibitors with in Vivo Activity. **J Med Chem**, 61, n. 13, p. 5547-5568, Jul 12 2018.

ALEY, S. B.; BATES, M. D.; TAM, J. P.; HOLLINGDALE, M. R. Synthetic peptides from the circumsporozoite proteins of Plasmodium falciparum and Plasmodium knowlesi recognize the human hepatoma cell line HepG2-A16 in vitro. **J Exp Med**, 164, n. 6, p. 1915-1922, Dec 1 1986.

ALIPRANDINI, E.; TAVARES, J.; PANATIERI, R. H.; THIBERGE, S. *et al.* Cytotoxic anti-circumsporozoite antibodies target malaria sporozoites in the host skin. **Nat Microbiol**, 3, n. 11, p. 1224-1233, Nov 2018.

ALLWINN, R.; ZEIDLER, B.; STEINHAGEN, K.; ROHWADER, E. *et al.* Assessment of mumps virus-specific antibodies by different serological assays: which test correlates best with mumps immunity? **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 30, n. 10, p. 1223-1228, Oct 2011.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S. *et al.* Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal. **Nat Med**, 12, n. 2, p. 220-224, Feb 2006.

ANGELETTI, D.; GIBBS, J. S.; ANGEL, M.; KOSIK, I. *et al.* Defining B cell immunodominance to viruses. **Nat Immunol**, 18, n. 4, p. 456-463, Apr 2017.

ANGELETTI, D.; KOSIK, I.; SANTOS, J. J. S.; YEWDELL, W. T. *et al.* Outflanking immunodominance to target subdominant broadly neutralizing epitopes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 116, n. 27, p. 13474-13479, Jul 2 2019.

ANTHONY, M. P.; BURROWS, J. N.; DUPARC, S.; MOEHRLE, J. J. *et al.* The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. **Malar J**, 11, p. 316, Sep 7 2012.

APOSTOLICO JDE, S.; LUNARDELLI, V. A.; COIRADA, F. C.; BOSCARDIN, S. B. *et al.* Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. **J Immunol Res**, 2016, p. 1459394, 2016.

- AREVALO-HERRERA, M.; VERA, O.; CASTELLANOS, A.; CESPEDES, N. *et al.* Preclinical vaccine study of Plasmodium vivax circumsporozoite protein derived-synthetic polypeptides formulated in montanide ISA 720 and montanide ISA 51 adjuvants. **Am J Trop Med Hyg**, 84, n. 2 Suppl, p. 21-27, Feb 2011.
- ARNOT, D. E.; BARNWELL, J. W.; STEWART, M. J. Does biased gene conversion influence polymorphism in the circumsporozoite protein-encoding gene of Plasmodium vivax? **Proc Natl Acad Sci U S A**, 85, n. 21, p. 8102-8106, Nov 1988.
- ARNOT, D. E.; BARNWELL, J. W.; TAM, J. P.; NUSSENZWEIG, V. *et al.* Circumsporozoite protein of Plasmodium vivax: gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science**, 230, n. 4727, p. 815-818, Nov 15 1985.
- ARRUDA, M. E.; ZIMMERMAN, R. H.; SOUZA, R. M.; OLIVEIRA-FERREIRA, J. Prevalence and level of antibodies to the circumsporozoite protein of human malaria parasites in five states of the Amazon region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 102, n. 3, p. 367-371, Jun 2007.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, K.; RILEY, E. M. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **J Immunol**, 169, n. 6, p. 2956-2963, Sep 15 2002.
- ASHLEY, E. A.; PYAE PHYO, A.; WOODROW, C. J. Malaria. **Lancet**, 391, n. 10130, p. 1608-1621, Apr 21 2018.
- AUCOUTURIER, J.; ASCARATEIL, S.; DUPUIS, L. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. **Vaccine**, 24 Suppl 2, p. S2-44-45, Apr 12 2006.
- BELL, B. A.; WOOD, J. F.; BANSAL, R.; RAGAB, H. *et al.* Process development for the production of an E. coli produced clinical grade recombinant malaria vaccine for Plasmodium vivax. **Vaccine**, 27, n. 9, p. 1448-1453, Feb 25 2009.
- BENNETT, J. W.; YADAVA, A.; TOSH, D.; SATTABONGKOT, J. *et al.* Phase 1/2a Trial of Plasmodium vivax Malaria Vaccine Candidate VMP001/AS01B in Malaria-Naive Adults: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 2, p. e0004423, Feb 2016.
- BERZOSA, P.; DE LUCIO, A.; ROMAY-BARJA, M.; HERRADOR, Z. *et al.* Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. **Malar J**, 17, n. 1, p. 333, Sep 17 2018.

- BETUELA, I.; ROSANAS-URGELL, A.; KINIBORO, B.; STANISIC, D. I. *et al.* Relapses contribute significantly to the risk of Plasmodium vivax infection and disease in Papua New Guinean children 1-5 years of age. **J Infect Dis**, 206, n. 11, p. 1771-1780, Dec 1 2012.
- BILGO, E.; LOVETT, B.; FANG, W.; BENDE, N. *et al.* Improved efficacy of an arthropod toxin expressing fungus against insecticide-resistant malaria-vector mosquitoes. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 3433, Jun 13 2017.
- BRASIL, P.; ZALIS, M. G.; DE PINA-COSTA, A.; SIQUEIRA, A. M. *et al.* Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **Lancet Glob Health**, 5, n. 10, p. e1038-e1046, Oct 2017.
- BUTCHER, G. A. The role of the spleen and immunization against malaria. **Trends Parasitol**, 21, n. 8, p. 356-357, Aug 2005.
- BUTLER, D. Mosquitoes score in chemical war. **Nature**, 475, n. 7354, p. 19, Jul 5 2011.
- BUTLER, D. Promising malaria vaccine to be tested in first large field trial. **Nature**, Apr 16 2019.
- CAMPO, J. J.; SACARLAL, J.; APONTE, J. J.; AIDE, P. *et al.* Duration of vaccine efficacy against malaria: 5th year of follow-up in children vaccinated with RTS,S/AS02 in Mozambique. **Vaccine**, 32, n. 19, p. 2209-2216, Apr 17 2014.
- CERAMI, C.; FREVERT, U.; SINNIS, P.; TAKACS, B. *et al.* The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum sporozoites. **Cell**, 70, n. 6, p. 1021-1033, Sep 18 1992.
- CIMICA, V.; GALARZA, J. M. Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines. **Clin Immunol**, 183, p. 99-108, Oct 2017.
- CLYDE, D. F. Immunity to falciparum and vivax malaria induced by irradiated sporozoites: a review of the University of Maryland studies, 1971-75. **Bull World Health Organ**, 68 Suppl, p. 9-12, 1990.
- COELHO, C. H.; DORITCHAMOU, J. Y. A.; ZAIDI, I.; DUFFY, P. E. Advances in malaria vaccine development: report from the 2017 malaria vaccine symposium. **NPJ Vaccines**, 2, p. 34, 2017.

- COELHO, H. C.; LOPES, S. C.; PIMENTEL, J. P.; NOGUEIRA, P. A. *et al.* Thrombocytopenia in Plasmodium vivax malaria is related to platelets phagocytosis. **PLoS One**, 8, n. 5, p. e63410, 2013.
- COGSWELL, F. B. The hypnozoite and relapse in primate malaria. **Clin Microbiol Rev**, 5, n. 1, p. 26-35, Jan 1992.
- COLLINS, W. E.; NUSSENZWEIG, R. S.; BALLOU, W. R.; RUEBUSH, T. K., 2nd *et al.* Immunization of Saimiri sciureus boliviensis with recombinant vaccines based on the circumsporozoite protein of Plasmodium vivax. **Am J Trop Med Hyg**, 40, n. 5, p. 455-464, May 1989.
- COPPI, A.; TEWARI, R.; BISHOP, J. R.; BENNETT, B. L. *et al.* Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to Plasmodium sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. **Cell Host Microbe**, 2, n. 5, p. 316-327, Nov 15 2007.
- CRAWLEY, J.; CHU, C.; MTOVE, G.; NOSTEN, F. Malaria in children. **Lancet**, 375, n. 9724, p. 1468-1481, Apr 24 2010.
- CRISCI, E.; BARCENA, J.; MONTOYA, M. Virus-like particles: the new frontier of vaccines for animal viral infections. **Vet Immunol Immunopathol**, 148, n. 3-4, p. 211-225, Aug 15 2012.
- CURADO, I.; DUARTE, A. M.; LAL, A. A.; OLIVEIRA, S. G. *et al.* Antibodies anti bloodstream and circumsporozoite antigens (Plasmodium vivax and Plasmodium malariae/P. brasilianum) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 92, n. 2, p. 235-243, Mar-Apr 1997.
- DAI, S.; WANG, H.; DENG, F. Advances and Challenges in Enveloped Virus-like Particle (VLP)-Based Vaccines. **Minireview Open Access** Vol. 2, 2018.
- DAILY, J. P. Shedding Light on the Role of the Skin in Vaccine-Induced Protection against the Malaria Sporozoite. **mBio**, 9, n. 6, Dec 11 2018.
- DAME, J. B.; WILLIAMS, J. L.; MCCUTCHAN, T. F.; WEBER, J. L. *et al.* Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. **Science**, 225, n. 4662, p. 593-599, Aug 10 1984.
- DE CAMARGO, T. M.; DE FREITAS, E. O.; GIMENEZ, A. M.; LIMA, L. C. *et al.* Prime-boost vaccination with recombinant protein and adenovirus-vector expressing Plasmodium vivax circumsporozoite protein (CSP) partially protects mice against Pb/Pv sporozoite challenge. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 1118, Jan 18 2018.

- DI PASQUALE, A.; PREISS, S.; TAVARES DA SILVA, F.; GARCON, N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. **Vaccines (Basel)**, 3, n. 2, p. 320-343, Apr 16 2015.
- DIDIERLAURENT, A. M.; LAUPEZE, B.; DI PASQUALE, A.; HERGLI, N. *et al.* Adjuvant system AS01: helping to overcome the challenges of modern vaccines. **Expert Rev Vaccines**, 16, n. 1, p. 55-63, Jan 2017.
- DIJANIC, C.; NICKERSON, J.; SHAKYA, S.; DIJANIC, A. *et al.* Relapsing Malaria: A Case Report of Primaquine Resistance. **Case Rep Infect Dis**, 2018, p. 9720823, 2018.
- DOOLAN, D. L.; DOBANO, C.; BAIRD, J. K. Acquired immunity to malaria. **Clin Microbiol Rev**, 22, n. 1, p. 13-36, Table of Contents, Jan 2009.
- DOOLAN, D. L.; MARTINEZ-ALIER, N. Immune response to pre-erythrocytic stages of malaria parasites. **Curr Mol Med**, 6, n. 2, p. 169-185, Mar 2006.
- DOUGLAS, N. M.; ANSTEY, N. M.; BUFFET, P. A.; POESPOPRODJO, J. R. *et al.* The anaemia of Plasmodium vivax malaria. **Malar J**, 11, p. 135, Apr 27 2012.
- EPSTEIN, J. E.; RICHIE, T. L. The whole parasite, pre-erythrocytic stage approach to malaria vaccine development: a review. **Curr Opin Infect Dis**, 26, n. 5, p. 420-428, Oct 2013.
- EPSTEIN, J. E.; TEWARI, K.; LYKE, K. E.; SIM, B. K. *et al.* Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic CD8(+) T cell immunity. **Science**, 334, n. 6055, p. 475-480, Oct 28 2011.
- ESPINOSA, D. A.; YADAVA, A.; ANGOV, E.; MAURIZIO, P. L. *et al.* Development of a chimeric Plasmodium berghei strain expressing the repeat region of the P. vivax circumsporozoite protein for in vivo evaluation of vaccine efficacy. **Infect Immun**, 81, n. 8, p. 2882-2887, Aug 2013.
- FABRIS, A. L.; NUNES, A. V.; SCHUCH, V.; DE PAULA-SILVA, M. *et al.* Hydroquinone exposure alters the morphology of lymphoid organs in vaccinated C57Bl/6 mice. **Environ Pollut**, 257, p. 113554, Feb 2020.
- FERRARO, B.; TALBOTT, K. T.; BALAKRISHNAN, A.; CISPER, N. *et al.* Inducing humoral and cellular responses to multiple sporozoite and liver-stage malaria antigens using exogenous plasmid DNA. **Infect Immun**, 81, n. 10, p. 3709-3720, Oct 2013.

FRIETZE, K. M.; PEABODY, D. S.; CHACKERIAN, B. Engineering virus-like particles as vaccine platforms. **Curr Opin Virol**, 18, p. 44-49, Jun 2016.

GACHELIN, G.; GARNER, P.; FERRONI, E.; VERHAVE, J. P. *et al.* Evidence and strategies for malaria prevention and control: a historical analysis. **Malar J**, 17, n. 1, p. 96, Feb 27 2018.

GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. Plasmodium vivax: who cares? **Malar J**, 7 Suppl 1, p. S9, Dec 11 2008.

GALIZI, R.; DOYLE, L. A.; MENICHELLI, M.; BERNARDINI, F. *et al.* A synthetic sex ratio distortion system for the control of the human malaria mosquito. **Nat Commun**, 5, p. 3977, Jun 10 2014.

GARCIA, L. S. Malaria. **Clin Lab Med**, 30, n. 1, p. 93-129, Mar 2010.

GARCON, N.; HEPPNER, D. G.; COHEN, J. Development of RTS,S/AS02: a purified subunit-based malaria vaccine candidate formulated with a novel adjuvant. **Expert Rev Vaccines**, 2, n. 2, p. 231-238, Apr 2003.

GIMENEZ, A. M.; FRANCOSO, K. S.; ERSCHING, J.; ICIMOTO, M. Y. *et al.* A recombinant multi-antigen vaccine formulation containing Babesia bovis merozoite surface antigens MSA-2a1, MSA-2b and MSA-2c elicits invasion-inhibitory antibodies and IFN-gamma producing cells. **Parasit Vectors**, 9, n. 1, p. 577, Nov 14 2016.

GIMENEZ, A. M.; LIMA, L. C.; FRANCOSO, K. S.; DENAPOLI, P. M. A. *et al.* Vaccine Containing the Three Allelic Variants of the Plasmodium vivax Circumsporozoite Antigen Induces Protection in Mice after Challenge with a Transgenic Rodent Malaria Parasite. **Front Immunol**, 8, p. 1275, 2017.

GONZALEZ, R.; PONS-DURAN, C.; PIQUERAS, M.; APONTE, J. J. *et al.* Mefloquine for preventing malaria in pregnant women. **Cochrane Database Syst Rev**, 3, p. CD011444, Mar 21 2018.

GOOD, M. F.; DOOLAN, D. L. Malaria vaccine design: immunological considerations. **Immunity**, 33, n. 4, p. 555-566, Oct 29 2010.

GRAUMANS, W.; JACOBS, E.; BOUSEMA, T.; SINNIS, P. When Is a Plasmodium-Infected Mosquito an Infectious Mosquito? **Trends Parasitol**, 36, n. 8, p. 705-716, Aug 2020.

GREENWOOD, B. Malaria vaccines. Evaluation and implementation. **Acta Trop**, 95, n. 3, p. 298-304, Sep 2005.

GUEIRARD, P.; TAVARES, J.; THIBERGE, S.; BERNEX, F. *et al.* Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107, n. 43, p. 18640-18645, Oct 26 2010.

HAFALLA, J. C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunol Rev**, 240, n. 1, p. 297-316, Mar 2011.

HAN, S. Clinical vaccine development. **Clin Exp Vaccine Res**, 4, n. 1, p. 46-53, Jan 2015.

HERRERA, S.; CORRADIN, G.; AREVALO-HERRERA, M. An update on the search for a Plasmodium vivax vaccine. **Trends Parasitol**, 23, n. 3, p. 122-128, Mar 2007.

HERRINGTON, D. A.; CLYDE, D. F.; LOSONSKY, G.; CORTESIA, M. *et al.* Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide malaria vaccine against Plasmodium falciparum sporozoites. **Nature**, 328, n. 6127, p. 257-259, Jul 16-22 1987.

HILL, D. R.; BAIRD, J. K.; PARISE, M. E.; LEWIS, L. S. *et al.* Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. **Am J Trop Med Hyg**, 75, n. 3, p. 402-415, Sep 2006.

HOFFMAN, S. L.; BILLINGSLEY, P. F.; JAMES, E.; RICHMAN, A. *et al.* Development of a metabolically active, non-replicating sporozoite vaccine to prevent Plasmodium falciparum malaria. **Hum Vaccin**, 6, n. 1, p. 97-106, Jan 2010.

HOFFMAN, S. L.; GOH, L. M.; LUKE, T. C.; SCHNEIDER, I. *et al.* Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated Plasmodium falciparum sporozoites. **J Infect Dis**, 185, n. 8, p. 1155-1164, Apr 15 2002.

HOLLINGDALE, M. R. Anti-sporozoite antibodies. **Bull World Health Organ**, 68 Suppl, p. 47-51, 1990.

HOLLINGDALE, M. R.; NARDIN, E. H.; THARAVANIJ, S.; SCHWARTZ, A. L. *et al.* Inhibition of entry of Plasmodium falciparum and P. vivax sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. **J Immunol**, 132, n. 2, p. 909-913, Feb 1984.

- HU, J.; CHEN, Z.; GU, J.; WAN, M. *et al.* Safety and immunogenicity of a malaria vaccine, Plasmodium falciparum AMA-1/MSP-1 chimeric protein formulated in montanide ISA 720 in healthy adults. **PLoS One**, 3, n. 4, p. e1952, Apr 9 2008.
- KAECH, S. M.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. **Nat Rev Immunol**, 2, n. 4, p. 251-262, Apr 2002.
- KAIN, K. C.; WIRTZ, R. A.; FERNANDEZ, I.; FRANKE, E. D. *et al.* Serologic and genetic characterization of Plasmodium vivax from whole blood-impregnated filter paper discs. **Am J Trop Med Hyg**, 46, n. 4, p. 473-479, Apr 1992.
- KANTELE, A.; JOKIRANTA, T. S. Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, Plasmodium knowlesi. **Clin Infect Dis**, 52, n. 11, p. 1356-1362, Jun 2011.
- KASTILAN, R.; BOES, A.; SPIEGEL, H.; VOEPEL, N. *et al.* Improvement of a fermentation process for the production of two PfAMA1-DiCo-based malaria vaccine candidates in Pichia pastoris. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 11991, Sep 20 2017.
- KASTURI, S. P.; KOZLOWSKI, P. A.; NAKAYA, H. I.; BURGER, M. C. *et al.* Adjuvanting a Simian Immunodeficiency Virus Vaccine with Toll-Like Receptor Ligands Encapsulated in Nanoparticles Induces Persistent Antibody Responses and Enhanced Protection in TRIM5alpha Restrictive Macaques. **J Virol**, 91, n. 4, Feb 15 2017.
- KESTER, K. E.; MCKINNEY, D. A.; TORNIEPORTH, N.; OCKENHOUSE, C. F. *et al.* A phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy bridging randomized study of a two-dose regimen of liquid and lyophilized formulations of the candidate malaria vaccine RTS,S/AS02A in malaria-naive adults. **Vaccine**, 25, n. 29, p. 5359-5366, Jul 20 2007.
- KINGSTON, R. L.; BAASE, W. A.; GAY, L. S. Characterization of nucleocapsid binding by the measles virus and mumps virus phosphoproteins. **J Virol**, 78, n. 16, p. 8630-8640, Aug 2004.
- KISALU, N. K.; IDRIS, A. H.; WEIDLE, C.; FLORES-GARCIA, Y. *et al.* A human monoclonal antibody prevents malaria infection by targeting a new site of vulnerability on the parasite. **Nat Med**, 24, n. 4, p. 408-416, May 2018.
- KRETTLI, A. U.; DANTAS, L. A. Which routes do Plasmodium sporozoites use for successful infections of vertebrates? **Infect Immun**, 68, n. 5, p. 3064-3065, May 2000.

- LEAL, M. T.; CAMACHO, A. G.; TEIXEIRA, L. H.; BARGIERI, D. Y. *et al.* Immunogenicity of recombinant proteins consisting of Plasmodium vivax circumsporozoite protein allelic variant-derived epitopes fused with Salmonella enterica Serovar Typhimurium flagellin. **Clin Vaccine Immunol**, 20, n. 9, p. 1418-1425, Sep 2013.
- LEE, J.; PAPARODITIS, P.; HORTON, A. P.; FRUHWIRTH, A. *et al.* Persistent Antibody Clonotypes Dominate the Serum Response to Influenza over Multiple Years and Repeated Vaccinations. **Cell Host Microbe**, 25, n. 3, p. 367-376 e365, Mar 13 2019.
- LIU, J.; DAI, S.; WANG, M.; HU, Z. *et al.* Virus like particle-based vaccines against emerging infectious disease viruses. **Virol Sin**, 31, n. 4, p. 279-287, Aug 2016.
- LLANOS-CUENTAS, A.; LACERDA, M. V. G.; HIEN, T. T.; VELEZ, I. D. *et al.* Tafenoquine versus Primaquine to Prevent Relapse of Plasmodium vivax Malaria. **N Engl J Med**, 380, n. 3, p. 229-241, Jan 17 2019.
- LYKE, K. E.; ISHIZUKA, A. S.; BERRY, A. A.; CHAKRAVARTY, S. *et al.* Attenuated PfSPZ Vaccine induces strain-transcending T cells and durable protection against heterologous controlled human malaria infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 114, n. 10, p. 2711-2716, Mar 7 2017.
- MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. **Yeast**, 22, n. 4, p. 249-270, Mar 2005.
- MACHADO, R. L.; DE FIGUEREIDO FILHO, A. F.; CALVOSA, V. S.; FIGUEREDO, M. C. *et al.* Correlation between Plasmodium vivax variants in Belem, Para State, Brazil and symptoms and clearance of parasitaemia. **Braz J Infect Dis**, 7, n. 3, p. 175-177, Jun 2003.
- MACHADO, R. L.; POVOA, M. M. Distribution of Plasmodium vivax variants (VK210, VK247 and P. vivax-like) in three endemic areas of the Amazon region of Brazil and their correlation with chloroquine treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 94, n. 4, p. 377-381, Jul-Aug 2000.
- MAL, E. R. A. C. G. o. V. A research agenda for malaria eradication: vaccines. **PLoS Med**, 8, n. 1, p. e1000398, Jan 25 2011.
- MARINHO, E. S. M.; SALLUM, M. A. M.; ROSA-FREITAS, M. G.; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. *et al.* Anophelines species and the receptivity and vulnerability to

malaria transmission in the Pantanal wetlands, Central Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 113, n. 2, p. 87-95, Feb 2018.

MATSUMOTO, M.; SEYA, T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). **Adv Drug Deliv Rev**, 60, n. 7, p. 805-812, Apr 29 2008.

MCCARTHY, J. S.; MARJASON, J.; ELLIOTT, S.; FAHEY, P. *et al.* A phase 1 trial of MSP2-C1, a blood-stage malaria vaccine containing 2 isoforms of MSP2 formulated with Montanide(R) ISA 720. **PLoS One**, 6, n. 9, p. e24413, 2011.

MCCUTCHAN, T. F.; KISSINGER, J. C.; TOURAY, M. G.; ROGERS, M. J. *et al.* Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malarias: biological and phylogenetic implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93, n. 21, p. 11889-11894, Oct 15 1996.

MCGHEE, J. R.; FUJIHASHI, K.; XU-AMANO, J.; JACKSON, R. J. *et al.* New perspectives in mucosal immunity with emphasis on vaccine development. **Semin Hematol**, 30, n. 4 Suppl 4, p. 3-12; discussion 13-15, Oct 1993.

MELTZER, E.; RAHAV, G.; SCHWARTZ, E. Vivax Malaria Chemoprophylaxis: The Role of Atovaquone-Proguanil Compared to Other Options. **Clin Infect Dis**, 66, n. 11, p. 1751-1755, May 17 2018.

MENARD, R. Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the Plasmodium sporozoite. **Cell Microbiol**, 3, n. 2, p. 63-73, Feb 2001.

MER, M.; DUNSER, M. W.; GIERA, R.; DONDORP, A. M. Severe malaria. Current concepts and practical overview: What every intensivist should know. **Intensive Care Med**, 46, n. 5, p. 907-918, May 2020.

MILES, A. P.; MCCLELLAN, H. A.; RAUSCH, K. M.; ZHU, D. *et al.* Montanide ISA 720 vaccines: quality control of emulsions, stability of formulated antigens, and comparative immunogenicity of vaccine formulations. **Vaccine**, 23, n. 19, p. 2530-2539, Mar 31 2005.

MOHSEN, M. O.; ZHA, L.; CABRAL-MIRANDA, G.; BACHMANN, M. F. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. **Semin Immunol**, 34, p. 123-132, Dec 2017.

MOODY, A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. **Clin Microbiol Rev**, 15, n. 1, p. 66-78, Jan 2002.

MOON, R. W.; SHARAF, H.; HASTINGS, C. H.; HO, Y. S. *et al.* Normocyte-binding protein required for human erythrocyte invasion by the zoonotic malaria parasite Plasmodium knowlesi. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 113, n. 26, p. 7231-7236, Jun 28 2016.

MORDMULLER, B.; SUPAN, C.; SIM, K. L.; GOMEZ-PEREZ, G. P. *et al.* Direct venous inoculation of Plasmodium falciparum sporozoites for controlled human malaria infection: a dose-finding trial in two centres. **Malar J**, 14, p. 117, Mar 18 2015.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; TSUBOI, T.; AREVALO-HERRERA, M. *et al.* Natural acquisition of immunity to Plasmodium vivax: epidemiological observations and potential targets. **Adv Parasitol**, 81, p. 77-131, 2013.

MUELLER, I.; SHAKRI, A. R.; CHITNIS, C. E. Development of vaccines for Plasmodium vivax malaria. **Vaccine**, 33, n. 52, p. 7489-7495, Dec 22 2015.

NARDIN, E. H.; NUSSENZWEIG, R. S. T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages. **Annu Rev Immunol**, 11, p. 687-727, 1993.

NOULIN, F.; BORLON, C.; VAN DEN ABBEELE, J.; D'ALESSANDRO, U. *et al.* 1912-2012: a century of research on Plasmodium vivax in vitro culture. **Trends Parasitol**, 29, n. 6, p. 286-294, Jun 2013.

NUSSENZWEIG, R. S.; VANDERBERG, J.; MOST, H.; ORTON, C. Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. **Nature**, 216, n. 5111, p. 160-162, Oct 14 1967.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. *et al.* Malaria in Brazil: an overview. **Malar J**, 9, p. 115, Apr 30 2010.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; PRATT-RICCIO, L. R.; ARRUDA, M.; SANTOS, F. *et al.* HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of P. vivax (VK210, VK247 and P. vivax-like) in individuals naturally exposed to malaria. **Acta Trop**, 92, n. 1, p. 63-69, Sep 2004.

OTHMAN, A. S.; MARIN-MOGOLLON, C.; SALMAN, A. M.; FRANKE-FAYARD, B. M. *et al.* The use of transgenic parasites in malaria vaccine research. **Expert Rev Vaccines**, 16, n. 7, p. 1-13, Jul 2017.

OYSTON, P.; ROBINSON, K. The current challenges for vaccine development. **J Med Microbiol**, 61, n. Pt 7, p. 889-894, Jul 2012.

PANCAKE, S. J.; HOLT, G. D.; MELLOUK, S.; HOFFMAN, S. L. Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. **J Cell Biol**, 117, n. 6, p. 1351-1357, Jun 1992.

PEPLOW, M. Synthetic biology's first malaria drug meets market resistance. **Nature**, 530, n. 7591, p. 389-390, Feb 25 2016.

PEREZ-MAZLIAH, D.; LANGHORNE, J. CD4 T-cell subsets in malaria: TH1/TH2 revisited. **Front Immunol**, 5, p. 671, 2014.

PETERS, A. L.; VAN NOORDEN, C. J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria: cytochemical detection of heterozygous G6PD deficiency in women. **J Histochem Cytochem**, 57, n. 11, p. 1003-1011, Nov 2009.

PHILLIPS, M. A.; BURROWS, J. N.; MANYANDO, C.; VAN HUIJSDUIJNEN, R. H. *et al.* Malaria. **Nat Rev Dis Primers**, 3, p. 17050, Aug 3 2017.

PHILLIPS, M. A.; LOTHARIUS, J.; MARSH, K.; WHITE, J. *et al.* A long-duration dihydroorotate dehydrogenase inhibitor (DSM265) for prevention and treatment of malaria. **Sci Transl Med**, 7, n. 296, p. 296ra111, Jul 15 2015.

POLAND, G. A.; OVSYANNIKOVA, I. G.; KENNEDY, R. B. Personalized vaccinology: A review. **Vaccine**, 36, n. 36, p. 5350-5357, Aug 28 2018.

QARI, S. H.; GOLDMAN, I. F.; POVOA, M. M.; OLIVEIRA, S. *et al.* Wide distribution of the variant form of the human malaria parasite Plasmodium vivax. **J Biol Chem**, 266, n. 25, p. 16297-16300, Sep 5 1991.

QARI, S. H.; SHI, Y. P.; GOLDMAN, I. F.; UDHAYAKUMAR, V. *et al.* Identification of Plasmodium vivax-like human malaria parasite. **Lancet**, 341, n. 8848, p. 780-783, Mar 27 1993.

RENIA, L.; GRILLOT, D.; MARUSSIG, M.; CORRADIN, G. *et al.* Effector functions of circumsporozoite peptide-primed CD4+ T cell clones against Plasmodium yoelii liver stages. **J Immunol**, 150, n. 4, p. 1471-1478, Feb 15 1993.

REYES-SANDOVAL, A.; BACHMANN, M. F. Plasmodium vivax malaria vaccines: why are we where we are? **Hum Vaccin Immunother**, 9, n. 12, p. 2558-2565, Dec 2013.

- RIECKMANN, K. H.; BEAUDOIN, R. L.; CASSELLS, J. S.; SELL, K. W. Use of attenuated sporozoites in the immunization of human volunteers against falciparum malaria. **Bull World Health Organ**, 57 Suppl 1, p. 261-265, 1979.
- RILEY, E. M.; WAHL, S.; PERKINS, D. J.; SCHOFIELD, L. Regulating immunity to malaria. **Parasite Immunol**, 28, n. 1-2, p. 35-49, Jan-Feb 2006.
- ROCAMORA, F.; ZHU, L.; LIONG, K. Y.; DONDORP, A. *et al.* Oxidative stress and protein damage responses mediate artemisinin resistance in malaria parasites. **PLoS Pathog**, 14, n. 3, p. e1006930, Mar 2018.
- ROESTENBERG, M.; REMARQUE, E.; DE JONGE, E.; HERMSEN, R. *et al.* Safety and immunogenicity of a recombinant Plasmodium falciparum AMA1 malaria vaccine adjuvanted with Alhydrogel, Montanide ISA 720 or AS02. **PLoS One**, 3, n. 12, p. e3960, 2008.
- ROMERO, P.; MARYANSKI, J. L.; CORRADIN, G.; NUSSENZWEIG, R. S. *et al.* Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. **Nature**, 341, n. 6240, p. 323-326, Sep 28 1989.
- ROSENBERG, R.; WIRTZ, R. A.; LANAR, D. E.; SATTABONGKOT, J. *et al.* Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite Plasmodium vivax. **Science**, 245, n. 4921, p. 973-976, Sep 1 1989.
- 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**, 84, n. 2, p. 209-212, Mar-Apr 1990.
- RTS, S. C. T. P. Efficacy and safety of the RTS,S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. **PLoS Med**, 11, n. 7, p. e1001685, Jul 2014.
- RTS, S. C. T. P.; AGNANDJI, S. T.; LELL, B.; FERNANDES, J. F. *et al.* A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. **N Engl J Med**, 367, n. 24, p. 2284-2295, Dec 13 2012.
- SABCHAREON, A.; BURNOUF, T.; OUATTARA, D.; ATTANATH, P. *et al.* Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. **Am J Trop Med Hyg**, 45, n. 3, p. 297-308, Sep 1991.
- SALEM, M. L.; DIAZ-MONTERO, C. M.; EL-NAGGAR, S. A.; CHEN, Y. et al. The TLR3 agonist poly(I:C) targets CD8+ T cells and augments their antigen-specific

responses upon their adoptive transfer into naive recipient mice. **Vaccine**, 27, n. 4, p. 549-557, Jan 22 2009.

SALEM, M. L.; EL-NAGGAR, S. A.; KADIMA, A.; GILLANDERS, W. E. *et al.* The adjuvant effects of the toll-like receptor 3 ligand polyinosinic-cytidylic acid poly (I:C) on antigen-specific CD8+ T cell responses are partially dependent on NK cells with the induction of a beneficial cytokine milieu. **Vaccine**, 24, n. 24, p. 5119-5132, Jun 12 2006.

SALMAN, A. M.; MONTOYA-DIAZ, E.; WEST, H.; LALL, A. *et al.* Rational development of a protective P. vivax vaccine evaluated with transgenic rodent parasite challenge models. **Sci Rep**, 7, p. 46482, Apr 18 2017.

SARASWAT, S.; ATHMARAM, T. N.; PARIDA, M.; AGARWAL, A. *et al.* Expression and Characterization of Yeast Derived Chikungunya Virus Like Particles (CHIK-VLPs) and Its Evaluation as a Potential Vaccine Candidate. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 7, p. e0004782, Jul 2016.

SCHNEIDER-OHRUM, K.; GILES, B. M.; WEIRBACK, H. K.; WILLIAMS, B. L. *et al.* Adjuvants that stimulate TLR3 or NLPR3 pathways enhance the efficiency of influenza virus-like particle vaccines in aged mice. **Vaccine**, 29, n. 48, p. 9081-9092, Nov 8 2011.

SCHWENK, R.; DEBOT, M.; PORTER, M.; NIKKI, J. *et al.* IgG2 antibodies against a clinical grade Plasmodium falciparum CSP vaccine antigen associate with protection against transgenic sporozoite challenge in mice. **PLoS One**, 9, n. 10, p. e111020, 2014.

SEKALY, R. P. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? **J Exp Med**, 205, n. 1, p. 7-12, Jan 21 2008.

SHORTT, H. E.; GARNHAM, P. C. Pre-erythrocytic stage in mammalian malaria parasites. **Nature**, 161, n. 4082, p. 126, Jan 24 1948.

SHUKLA, R.; RAJPOOT, R. K.; ARORA, U.; PODDAR, A. *et al.* Pichia pastoris-Expressed Bivalent Virus-Like Particulate Vaccine Induces Domain III-Focused Bivalent Neutralizing Antibodies without Antibody-Dependent Enhancement in Vivo. **Front Microbiol**, 8, p. 2644, 2017.

SIDJANSKI, S.; VANDERBERG, J. P. Delayed migration of Plasmodium sporozoites from the mosquito bite site to the blood. **Am J Trop Med Hyg**, 57, n. 4, p. 426-429, Oct 1997.

- SILVEIRA, E. L.; KASTURI, S. P.; KOVALENKOV, Y.; RASHEED, A. U. *et al.* Vaccine-induced plasmablast responses in rhesus macaques: phenotypic characterization and a source for generating antigen-specific monoclonal antibodies. **J Immunol Methods**, 416, p. 69-83, Jan 2015.
- SILVIE, O.; AMINO, R.; HAFALLA, J. C. Tissue-specific cellular immune responses to malaria pre-erythrocytic stages. **Curr Opin Microbiol**, 40, p. 160-167, Dec 2017.
- SILVIE, O.; FRANETICH, J. F.; BOUCHEIX, C.; RUBINSTEIN, E. *et al.* Alternative invasion pathways for Plasmodium berghei sporozoites. **Int J Parasitol**, 37, n. 2, p. 173-182, Feb 2007.
- SIMONETTI, A. B. The biology of malarial parasite in the mosquito--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 91, n. 5, p. 519-541, Sep-Oct 1996.
- SIRAWARAPORN, W.; SATHITKUL, T.; SIRAWARAPORN, R.; YUTHAVONG, Y. *et al.* Antifolate-resistant mutants of Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94, n. 4, p. 1124-1129, Feb 18 1997.
- SLIBINSKAS, R.; ZVIRBLIENE, A.; GEDVILAITE, A.; SAMUEL, D. *et al.* Synthesis of mumps virus nucleocapsid protein in yeast Pichia pastoris. **J Biotechnol**, 103, n. 1, p. 43-49, Jun 12 2003.
- SOARES, I. F.; LOPEZ-CAMACHO, C.; RODRIGUES-DA-SILVA, R. N.; DA SILVA MATOS, A. *et al.* Recombinant Plasmodium vivax circumsporozoite surface protein allelic variants: antibody recognition by individuals from three communities in the Brazilian Amazon. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 14020, Aug 20 2020.
- STEWART, M. J.; NAWROT, R. J.; SCHULMAN, S.; VANDERBERG, J. P. Plasmodium berghei sporozoite invasion is blocked in vitro by sporozoite-immobilizing antibodies. **Infect Immun**, 51, n. 3, p. 859-864, Mar 1986.
- STORTI-MELO, L. M.; DE SOUZA-NEIRAS, W. C.; CASSIANO, G. C.; JOAZEIRO, A. C. *et al.* Plasmodium vivax circumsporozoite variants and Duffy blood group genotypes in the Brazilian Amazon region. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 103, n. 7, p. 672-678, Jul 2009.
- STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T. *et al.* Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, 313, n. 5791, p. 1287-1290, Sep 1 2006.

SVS-MS. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 16, 2020. **Boletim Epidemiológico**, 51, n. 17, 04/2020 2020.

TA, T. H.; HISAM, S.; LANZA, M.; JIRAM, A. I. *et al.* First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi. **Malar J**, 13, p. 68, Feb 24 2014.

TANGPUKDEE, N.; DUANGDEE, C.; WILAIRATANA, P.; KRUDSOOD, S. Malaria diagnosis: a brief review. **Korean J Parasitol**, 47, n. 2, p. 93-102, Jun 2009.

TARUN, A. S.; BAER, K.; DUMPIT, R. F.; GRAY, S. *et al.* Quantitative isolation and in vivo imaging of malaria parasite liver stages. **Int J Parasitol**, 36, n. 12, p. 1283-1293, Oct 2006.

TEIXEIRA, L. H.; TARARAM, C. A.; LASARO, M. O.; CAMACHO, A. G. *et al.* Immunogenicity of a prime-boost vaccine containing the circumsporozoite proteins of Plasmodium vivax in rodents. **Infect Immun**, 82, n. 2, p. 793-807, Feb 2014.

TICKELL-PAINTER, M.; MAAYAN, N.; SAUNDERS, R.; PACE, C. *et al.* Mefloquine for preventing malaria during travel to endemic areas. **Cochrane Database Syst Rev**, 10, p. CD006491, Oct 30 2017.

TSE, E. G.; KORSIK, M.; TODD, M. H. The past, present and future of anti-malarial medicines. **Malar J**, 18, n. 1, p. 93, Mar 22 2019.

TUJU, J.; KAMUYU, G.; MURUNGI, L. M.; OSIER, F. H. A. Vaccine candidate discovery for the next generation of malaria vaccines. **Immunology**, 152, n. 2, p. 195-206, Oct 2017.

UDOMSANGPETCH, R.; KANEKO, O.; CHOTIVANICH, K.; SATTABONGKOT, J. Cultivation of Plasmodium vivax. **Trends Parasitol**, 24, n. 2, p. 85-88, Feb 2008.

VANDOOLAEGHE, P.; SCHUERMAN, L. The RTS,S/AS01 malaria vaccine in children 5 to 17 months of age at first vaccination. **Expert Rev Vaccines**, 15, n. 12, p. 1481-1493, Dec 2016.

VANLOUBBEECK, Y.; PICHYANGKUL, S.; BAYAT, B.; YONGVANITCHIT, K. *et al.* Comparison of the immune responses induced by soluble and particulate Plasmodium vivax circumsporozoite vaccine candidates formulated in AS01 in rhesus macaques. **Vaccine**, 31, n. 52, p. 6216-6224, Dec 16 2013.

- VERMA, R.; BOLETI, E.; GEORGE, A. J. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. **J Immunol Methods**, 216, n. 1-2, p. 165-181, Jul 1 1998.
- VICENTIN, E. C.; FRANCOSO, K. S.; ROCHA, M. V.; IOURTOV, D. *et al.* Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with Plasmodium vivax apical membrane antigen-1 expressed in Pichia pastoris yeast. **Infect Immun**, 82, n. 3, p. 1296-1307, Mar 2014.
- WANG, M.; JIANG, S.; WANG, Y. Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in Pichia pastoris. **Bioengineered**, 7, n. 3, p. 155-165, Apr 2016.
- WELLS, T. N.; BURROWS, J. N.; BAIRD, J. K. Targeting the hypnozoite reservoir of Plasmodium vivax: the hidden obstacle to malaria elimination. **Trends Parasitol**, 26, n. 3, p. 145-151, Mar 2010.
- WHITE, M.; AMINO, R.; MUELLER, I. Theoretical Implications of a Pre-Erythrocytic Plasmodium vivax Vaccine for Preventing Relapses. **Trends Parasitol**, 33, n. 4, p. 260-263, Apr 2017.
- WHITE, M. T.; BEJON, P.; OLOTU, A.; GRIFFIN, J. T. *et al.* The relationship between RTS,S vaccine-induced antibodies, CD4(+) T cell responses and protection against Plasmodium falciparum infection. **PLoS One**, 8, n. 4, p. e61395, 2013.
- WHITE, M. T.; VERITY, R.; GRIFFIN, J. T.; ASANTE, K. P. *et al.* Immunogenicity of the RTS,S/AS01 malaria vaccine and implications for duration of vaccine efficacy: secondary analysis of data from a phase 3 randomised controlled trial. **Lancet Infect Dis**, 15, n. 12, p. 1450-1458, Dec 2015.
- WHITE, N. J. Determinants of relapse periodicity in Plasmodium vivax malaria. **Malar J**, 10, p. 297, Oct 11 2011.
- WHO. WHO World Malaria Report. World Health Organization. 2019.
- WYLER, D. J.; MILLER, L. H.; SCHMIDT, L. H. Spleen function in quartan malaria (due to Plasmodium inui): evidence for both protective and suppressive roles in host defense. **J Infect Dis**, 135, n. 1, p. 86-93, Jan 1977.
- YADAVA, A.; NURMUKHAMBETOVA, S.; PICHUGIN, A. V.; LUMSDEN, J. M. Cross-species immunity following immunization with a circumsporozoite protein-based vaccine for malaria. **J Infect Dis**, 205, n. 9, p. 1456-1463, May 1 2012.

YADAVA, A.; SATTABONGKOT, J.; WASHINGTON, M. A.; WARE, L. A. *et al.* A novel chimeric Plasmodium vivax circumsporozoite protein induces biologically functional antibodies that recognize both VK210 and VK247 sporozoites. **Infect Immun**, 75, n. 3, p. 1177-1185, Mar 2007.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; HOSHINO, K. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science**, 301, n. 5633, p. 640-643, Aug 1 2003.

YU, M.; LEVINE, S. J. Toll-like receptor, RIG-I-like receptors and the NLRP3 inflammasome: key modulators of innate immune responses to double-stranded RNA viruses. **Cytokine Growth Factor Rev**, 22, n. 2, p. 63-72, Apr 2011.

ANEXOS