

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
Área de Fisiopatologia

Avaliação da imunogenicidade de diferentes formas alélicas da proteína recombinante PvAMA-1  
expressa em *Pichia pastoris*: impacto da diversidade antigênica

Juliana Inês Branco

Dissertação para obtenção do Título de Mestre  
Orientador: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo  
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
Área de Fisiopatologia

Avaliação da imunogenicidade de diferentes formas alélicas da proteína recombinante PvAMA-1  
expressa em *Pichia pastoris*: impacto da diversidade antigênica

Juliana Inês Branco

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo

2018

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela 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

Branco, Juliana Inês  
B816a Avaliação da imunogenicidade de diferentes formas alélicas  
da proteína recombinante PvAMA-1 expressa em *Pichia  
pastoris* : impacto da diversidade antigênica / Juliana Inês  
Branco. -- São Paulo, 2018.  
95p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas  
e Toxicológicas.  
Orientador: Soares, Irene da Silva

1. Imunologia : Plasmodium vivax. 2. Vacina : Farmacologia  
3. Malária. 4. Proteína recombinante. 5. Antígeno. I. T. II.  
Soares, Irene da Silva, orientador.

616.9362079 CDD

Juliana Inês Branco

Avaliação da imunogenicidade de diferentes formas alélicas da proteína recombinante PvAMA-1  
expressa em *Pichia pastoris*: impacto da diversidade antigênica

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Presidente

Dra. Irene da Silva Soares

1º Examinador

Dra. Daniela Santoro Rosa

2º Examinador

Dra. Silvia Beatriz Boscardin

3º Examinador

Dr. Eduardo Lani Volpi da Silveira

São Paulo, 21 de setembro de 2018.

Ao meu pai Salomão Luiz Branco  
(*in memoriam*), por todos os  
exemplos, pelo carinho e por sempre  
estar ao meu lado.  
Até breve!

À minha mãe Jurema e meu irmão  
Leandro pelo apoio e suporte  
incondicionais e em todos os  
momentos. Amo vocês família!

À Gabriela Branco, menina que atualizou minhas configurações de amor puro e verdadeiro. A dinda te ama muito!

À Katia Sanches Françaço, por todo o suporte prestado nos momentos em que mais precisei. Você é muito mais que uma amiga. Ao Denis, agradeço pela amizade e boas conversas, e a Bia que mesmo não sabendo diminuiu minha saudade da Gabi.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra Irene da Silva Soares pela oportunidade de ingresso no programa de pós-graduação.

À Dra. Luciana Chagas de Lima pela contribuição experimental neste trabalho na fase de análise dos plasmídeos e transformação das leveduras *Pichia pastoris*, durante seu pós-doutorado no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

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

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, seus laboratórios, funcionários e secretárias. Obrigada pela disposição em ajudar e pelas orientações prestadas.

Aos professores doutores Daniel Youssef Bargieri, Silvia Beatriz Boscardin e Sabrina Epiphanyo pela contribuição no momento da qualificação.

Ao Professor Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira pelas orientações e auxílio essencial na submissão dos documentos para inscrição na seleção do programa de estágio de verão na Universidade de Oxford, eu não teria conseguido chegar lá sem a sua ajuda professor. Muito obrigada!

Aos demais professores e seus orientandos que compõem o Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela cessão da utilização de equipamentos e disponibilidade para discussões.

Ao biotério do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo (IQ/USP) e seus funcionários, por dispor da sua área experimental para a realização dos estudos pré-clínicos.

À mestre e técnica do Laboratório de Parasitologia da FCF/USP Kátia Sanches Françoso, por toda a contribuição prestada neste trabalho, principalmente no treinamento das técnicas de obtenção e purificação de proteínas e ELISA.

Ao Doutorando Rodolfo Ferreira Marques do Laboratório de Parasitologia FCF/USP pela manipulação dos animais no biotério, imunizando-os com as formulações vacinais e realizando as coletas sanguíneas durante os ensaios de imunização e pelo apoio incondicional no desenvolvimento deste trabalho de dissertação.

À Doutora Elisangela Oliveira de Freitas por toda a contribuição prestada neste trabalho, principalmente no treinamento das técnicas de manipulação animal.

Aos técnicos do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) Renata Albuquerque e Maurício dos Santos, e a técnica do Laboratório de Microbiologia da FCF/USP Fabiana Teixeira por toda a contribuição prestada neste trabalho e por todo o carinho.

À minha cunhada Daiana Branco e minha sobrinha Gabriela, pelo apoio e carinho.

À Vivian pela amizade, pelos convites fabulosos de almoço no bandeirão central ou da química, e por todo o carinho comigo sempre.

Aos amigos doutores Luciana e Antônio, e ao doutorando Gustavo pela amizade, pelo carinho e por terem auxiliado na revisão deste trabalho.

À minha família de Florianópolis, os Salles, os Souza, os Medeiros e os Eiras queridos que me acompanham e torcem por mim desde a graduação. Vocês são meu presente UFSC, fazem de toda visita à Ilha de Santa Catarina uma visita épica. Amo vocês.

À Rosalba Ferreira, secretária do curso de graduação em Farmácia da UFSC e mãe zelosa de todos os alunos de graduação, por todo o carinho e por ter agilizado a colação de grau em gabinete e liberação de diploma de graduação em tempo recorde permitindo minha transição para o mestrado sem nenhuma pendência com a universidade de origem.

Aos amigos, professores e funcionários da Universidade Federal de Santa Catarina, por terem participado efetivamente da minha formação profissional como farmacêutica bioquímica, por todas as lições vividas e aprendidas e pela oportunidade de estágio obrigatório em Análises Clínicas no Hospital Universitário da USP. A partir do convênio estabelecido entre as universidades.

À Elenice Vicente Rodrigues, Lelê maratonista e campeã, à Neide, Msc Daniel, e Dras Denise e Marlene, agradeço a vocês pelo carinho e amizade, pelos ensinamentos passados para nós com todo o carinho pela profissão, pelo convívio diário e pelas lições e atenção para cada todos.

Ao farmacêutico Valdir Santos do Hospital Universitário da USP, não só por ter me despertado para o mestrado, mas também pela amizade o carinho e as lições.

Aos amigos do Hospital Universitário da USP, pelos ensinamentos, pelo convívio durante o estágio obrigatório por todo o carinho e atenção prestados.

A querida Sueli Providelo e seu esposo Osvaldo Cirilo da Silva, pela amizade e o carinho, pelos bons conselhos e pelas risadas.

Ao Seminário Laveran & Deane de Malária, o qual tive a feliz oportunidade de participar no primeiro ano do mestrado, por todas as contribuições prestadas pelos pesquisadores.

Ao Departamento de Medicina da Universidade de Oxford pela oportunidade de estágio e premiação fornecida para o cumprimento do mesmo, aos amigos Ariane Gomes, Erwan Atcheson e Mona Mohsen, pela amizade, carinho e auxílio prestados durante o período de estágio. Aos demais alunos e funcionários do Jenner Institute pelo convívio e suporte prestados.

Ao amigo Andrey Alexandrino, pela amizade que construímos pela família que ganhei, diretamente do Acre. Agradeço por todo o carinho.

Ao querido amigo Mark Webb, pela amizade por estar comigo sempre.

À Deus, sempre, pois sem a Sua presença não haveriam caminhos.

## RESUMO

BRANCO, J. I. **Avaliação da imunogenicidade de diferentes formas alélicas da proteína PvAMA-1 expressa em *Pichia pastoris*: impacto da diversidade antigênica.** 2018. 94f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A malária é um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Em 2016, o número de casos estimado pela Organização Mundial de Saúde foi de 216 milhões. *Plasmodium falciparum* é a espécie mais prevalente e responsável pelo maior número de mortes no mundo, sobretudo no continente africano. Por outro lado, o *Plasmodium vivax* é conhecido por sua ampla distribuição geográfica, sendo a espécie que predomina nas Américas, incluindo o Brasil. Nos últimos 20 anos, nosso grupo tem gerado e caracterizado diversas proteínas recombinantes baseadas em antígenos imunodominantes de *P. vivax* que podem servir como base para o desenvolvimento de uma vacina contra malária. Entre os antígenos de merozoítas, uma das principais proteínas em estudo pelo nosso grupo é o Antígeno 1 de Membrana Apical de *P. vivax* (PvAMA-1), caracterizado previamente como altamente imunogênico em infecções naturais e em camundongos imunizados, na presença de diferentes adjuvantes. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da diversidade antigênica dessa proteína no reconhecimento por anticorpos específicos e na indução de imunidade contra o parasita. Para isso, foram geradas seis novas proteínas representando diferentes alelos descritos na natureza: PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-Sal-I, PvAMA-1-Chesson-I, PvAMA-1-SK0814-apical, PvAMA-1-Indonésia-XIX e PvAMA-1-PNG\_62\_MU. As proteínas recombinantes foram expressas em leveduras *Pichia pastoris* e purificadas em duas etapas cromatográficas. Em seguida, as imunizações em camundongos C57BL/6 foram realizadas com as proteínas administradas de forma isolada, ou em combinação, na presença do adjuvante agonista de TLR3 (Poly I:C). Por ELISA, observamos que todas as formulações foram capazes de induzir anticorpos IgG contra as proteínas homólogas e heterólogas, o que sugere que a diversidade antigênica entre as formas alélicas não compromete o reconhecimento. Os dados gerados no presente trabalho sugerem que uma formulação contendo mistura de diferentes alelos representando a proteína AMA-1 pode ser explorada para o desenvolvimento de uma vacina de ampla cobertura contra o *P. vivax*.

**Palavras-chave:** *Plasmodium vivax*, *Pichia pastoris*, vacina recombinante.

## ABSTRACT

BRANCO, J. I. **Evaluation of the immunogenicity of different allelic forms of PvAMA-1 protein expressed in *Pichia pastoris*: impact of antigenic diversity.** 2018. 94p. Dissertation (Master's degree) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Malaria is a public health problem in Brazil and throughout the world. In 2016, the World Health Organization estimated there were 216 million cases of malaria. *Plasmodium falciparum* is the most prevalent species and is responsible for the largest number of deaths, especially in the African continent. However, *Plasmodium vivax* is known for its wide geographic distribution, being the species that prevails in the Americas, including Brazil. In the last 20 years, our group has generated and characterized several recombinant proteins based on immunodominant antigens of *P. vivax* that can serve as a basis for the development of a malaria vaccine. Among the merozoite antigens, one of the main proteins studied by our group is *P. vivax* apical membrane antigen-1 (PvAMA-1), previously characterized as highly immunogenic in natural infections and immunized mice, in the presence of different adjuvants. The objective of this study was to investigate the effect of antigenic diversity of this protein in the recognition of specific antibodies and the induction of immunity against the parasite. For this, six new proteins were generated representing different alleles described in nature: PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-Sal-i, PvAMA-1-Chesson-i, PvAMA-1-SK0814-apical, PvAMA-1-Indonesia-XIX, and PvAMA-1-PNG\_62\_MU. Recombinant proteins were expressed in *Pichia pastoris* yeast and purified by two chromatographic stages. Then, C57BL/6 mice were immunized with these proteins administered in isolation or in combination, in the presence of the TLR3 agonist adjuvant, Poly I:C. Using an enzyme-linked immunosorbent assay, we observed that all formulations induced IgG antibodies against homologous and heterologous proteins. This indicates that antigenic diversity between allele forms does not compromise recognition. This finding suggests that a formulation containing a mixture of different alleles representing the PvAMA-1 protein can be exploited for developing of a wide coverage vaccine against *P. vivax*.

Key words: *Plasmodium vivax*, *Pichia pastoris*, recombinant vaccine.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Número de casos confirmados de malária a cada 1000 habitantes em 2016... 3	3
<b>Figura 2:</b> Ciclo de vida do <i>Plasmodium spp.</i> ..... 5	5
<b>Figura 3:</b> Modelo representativo da função da proteína AMA-1 durante a invasão da célula sanguínea..... 10	10
<b>Figura 4:</b> Estrutura cristal e representação esquemática da proteína PvAMA-1..... 11	11
<b>Figura 5:</b> A relação filogenética entre as novas sequências PvAMA-1 com adição do gene que corresponde a proteína yPvAMA-1 ..... 18	18
<b>Figura 6:</b> Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondentes as proteínas PvAMA-1. .... 19	19
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática da estrutura geral do gene sintético PvAMA-1 subclonada no vetor pPIC9K..... 20	20
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática das imunizações, coleta sanguínea e análise dos títulos de anticorpos IgG induzidos na análise curva dose resposta..... 27	27
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática das imunizações, coleta sanguínea e análise dos títulos de anticorpos IgG induzidos na análise da imunogenicidade das novas proteínas PvAMA-1. .... 29	29
<b>Figura 10:</b> Detecção por <i>immunoblotting</i> das novas proteínas PvAMA-1..... 34	34
<b>Figura 11:</b> Padrão de migração das novas proteínas PvAMA-1 ..... 34	34
<b>Figura 12:</b> Purificação por afinidade da proteína PvAMA-1-Belem. .... 35	35
<b>Figura 13:</b> Purificação por afinidade da proteína PvAMA-1-Chesson-I..... 36	36
<b>Figura 14:</b> Purificação por afinidade da proteína PvAMA-1-Indonesia-XIX..... 37	37
<b>Figura 15:</b> Purificação por afinidade da proteína PvAMA-1-PNG_62_MU. .... 38	38
<b>Figura 16:</b> Purificação por afinidade da proteína PvAMA-1-Sal-I. .... 39	39
<b>Figura 17:</b> Purificação por afinidade da proteína PvAMA-1-SK0814-apical..... 40	40
<b>Figura 18:</b> Purificação por troca iônica da proteína PvAMA-1-Belem. .... 41	41
<b>Figura 19:</b> Purificação por troca iônica da proteína PvAMA-1-Chesson-I..... 42	42
<b>Figura 20:</b> Purificação por troca iônica da proteína PvAMA-1-Indonesia-XIX..... 43	43
<b>Figura 21:</b> Purificação por troca iônica da proteína PvAMA-1-PNG_62_MU. .... 44	44
<b>Figura 22:</b> Purificação por troca iônica para proteína PvAMA-1-Sal-I. .... 45	45
<b>Figura 23:</b> Purificação por troca iônica para proteína PvAMA-1-SK0814-apical..... 46	46

<b>Figura 24:</b> Análise da resposta de anticorpos IgG após a imunização de camundongos com a proteína recombinante PvAMA-1-Chesson-I. ....	48
<b>Figura 25:</b> Análise da resposta de anticorpos IgG após a imunização de camundongos com as novas proteínas PvAMA-1. ....	49
<b>Figura 26:</b> Análise da resposta de anticorpos IgG após a imunização de camundongos com o mix contendo as novas proteínas PvAMA-1. ....	50
<b>Figura 27:</b> Os anticorpos anti-PvAMA-1 reconhecem as variantes alélicas de PvAMA-1. ....	52
<b>Figura suplementar 1:</b> Estabelecimento das condições para cultura dos novos clones PvAMA-1. ....	69
<b>Figura suplementar 2:</b> Estabelecimento das condições de indução (metanol) para otimização da expressão das novas proteínas PvAMA-1. ....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Condições de cultura e indução (metanol) para a expressão das novas proteínas PvAMA-1.....	33
<b>Tabela 2</b> – Rendimento obtido para as novas proteínas PvAMA-1.....	47

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 CICLO DE VIDA DO <i>Plasmodium spp</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 UTILIZAÇÃO DE VACINAS NO COMBATE A MALÁRIA .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 ANTÍGENO 1 DE MEMBRANA APICAL (AMA-1) .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 ADJUVANTE POLY(I:C) .....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 GENES SINTÉTICOS PvAMA-1 .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3 SELEÇÃO DOS CLONES TRANSFORMANTES.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PvAMA-1 EM PEQUENA E MÉDIA ESCALA .....</b>	<b>22</b>
<b>3.5 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PvAMA-1 .....</b>	<b>23</b>
<b>3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NOVAS PROTEÍNAS PvAMA-1 .....</b>	<b>24</b>
<b>3.6.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) .....</b>	<b>24</b>
<b>3.6.2 IMMUNOBLOTTING .....</b>	<b>25</b>
<b>3.7 ANÁLISE DA IMUNOGENICIDADE EM CAMUNDONGOS.....</b>	<b>26</b>
<b>3.7.1 ANIMAIS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.7.2 IMUNIZAÇÕES EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>30</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 OBTENÇÃO DAS NOVAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES BASEADAS NO ECTODOMÍNIO DE PvAMA-1 .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2 DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA DE ANTICORPOS INDUZIDA EM CAMUNDONGOS A PARTIR DA VACINAÇÃO COM AS NOVAS PROTEÍNAS PvAMA-1.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.1 DETERMINAÇÃO DA MAGNITUDE DA RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG CONTRA A PROTEÍNA PvAMA-1-CHESSON-I EM DIFERENTES CONDIÇÕES .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.2 DETERMINAÇÃO DA MAGNITUDE DA RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG CONTRA AS NOVAS PROTEÍNAS PvAMA-1 .....</b>	<b>48</b>

<b>4.2.3 DETERMINAÇÃO DA MAGNITUDE DA RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG OBTIDA CONTRA O MIX DAS NOVAS PROTEÍNAS PvAMA-1.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2.4 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS OBTIDOS A PARTIR DA IMUNIZAÇÃO COM AS NOVAS PROTEÍNAS PvAMA-1.....</b>	<b>50</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>61</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR .....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>71</b>

## ***INTRODUÇÃO***

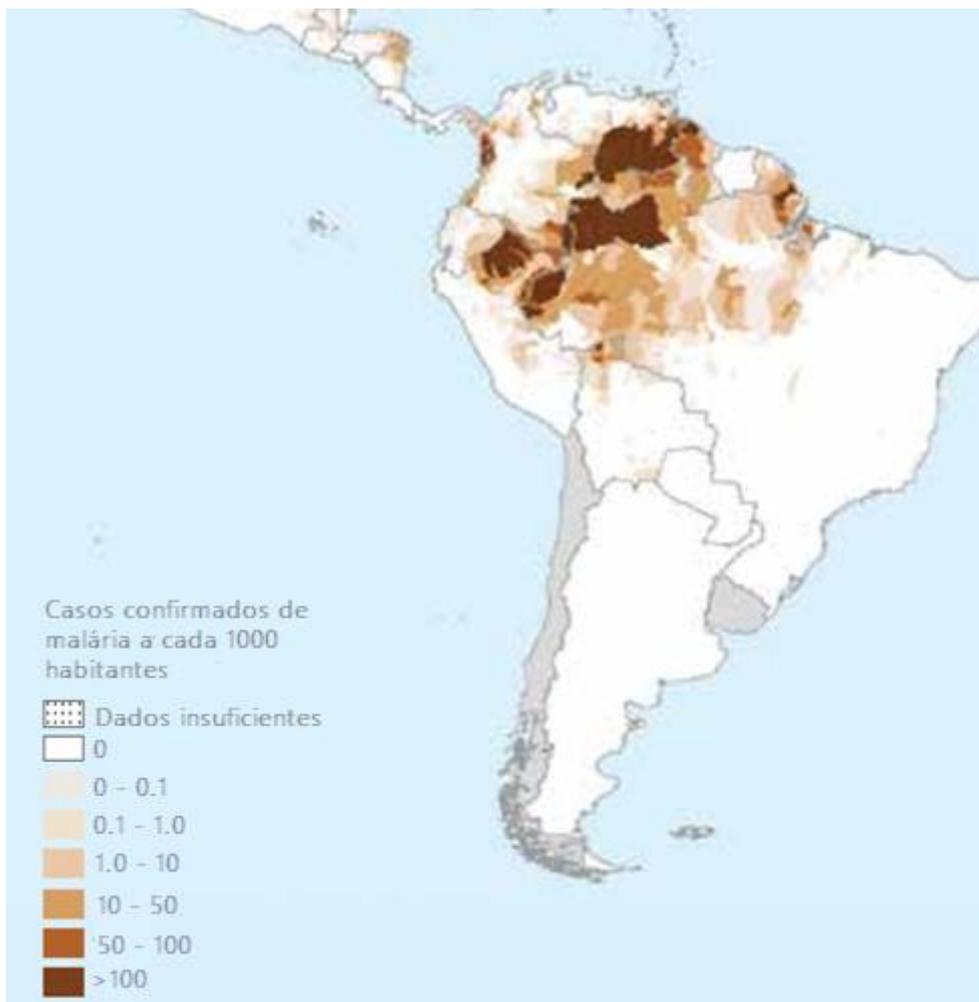
## 1 INTRODUÇÃO

A malária, é uma doença parasitária, que representa um significativo problema de saúde em várias partes do mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2016 foram estimados cerca de 216 milhões de casos de malária no mundo, com um aumento notável se comparado ao número de 211 milhões de casos registrados no ano de 2015 (WHO, 2017a). A doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e sete espécies são capazes de infectar o homem, sendo elas: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. ovale*, *P. simium* e *P. cynomolgi* (BRASIL et al., 2017; WHO, 2015). Entre essas espécies se destacam *P. falciparum* e *P. vivax* que são responsáveis pelo maior número de casos. *P. falciparum* é espécie prevalente na região africana e representou 99% dos casos confirmados na região da África subsaariana em 2016. Fora da África, *P. vivax* é o parasita predominante entre os casos confirmados de malária, principalmente na região das Américas onde correspondeu a 64% dos casos (WHO, 2017a).

Na região das Américas, o número estimado de pessoas vivendo sob o risco de contrair malária foi de 126,8 milhões no ano de 2016 (WHO, 2017a). O panorama dos casos de malária registrados em 2016 na região das Américas está ilustrado na Figura 1. De 2010 a 2016, foi observada uma redução significativa no número de casos e mortes por malária nessa região. Em vista ao esforço em eliminar a malária das Américas, esta região apresenta oito países que buscam a erradicação da doença até 2020 e são eles: Argentina, Belize, Costa Rica, Equador, El Salvador, México, Paraguai e Suriname. Dentre esses, destacam-se Argentina e Paraguai que não apresentam casos de malária contraídos em seus territórios há pelos menos três anos consecutivos. Assim, esses dois países não tendo nenhum caso registrado no ano corrente de 2016, tiveram em 2017 seus processos de certificação pela OMS iniciados (WHO, 2017a). No entanto, os países Nicarágua, Panamá, Peru e Venezuela apresentaram aumento no número de casos de malária no ano de 2016 comparado ao ano de 2010, de acordo com os dados divulgados pela OMS (WHO, 2017a).

Dentro desse contexto, o Brasil atualmente encontra-se classificado como país em situação de controle da malária para a OMS (WHO, 2017a). Com relação à área endêmica, no país, essa compreende a região amazônica brasileira, incluindo os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão. Essa

região é responsável pela maior parte dos casos autóctones registrados no país. A maior parte dos casos de malária registrados fora da região Amazônica são importados de estados pertencentes à área endêmica brasileira, de outros países amazônicos, ou do continente africano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Fora da região amazônica ainda há ocorrência de transmissão residual de malária nos estados do Piauí, Paraná e em áreas de Mata Atlântica nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).



**Figura 1: Número de casos confirmados de malária a cada 1000 habitantes em 2016.** Material adaptado do World Malaria Report 2017 (WHO, 2017a).

O controle da malária no Brasil é gerido pelo Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) vinculado ao Ministério da Saúde. Através deste programa, o Ministério da Saúde estabelece uma política permanente para prevenção e controle da doença no país, além de contar com o apoio da rede estruturada do Sistema Único de Saúde (SUS) para atender a todas as regiões. A notificação dos casos de malária no Brasil é feita tanto

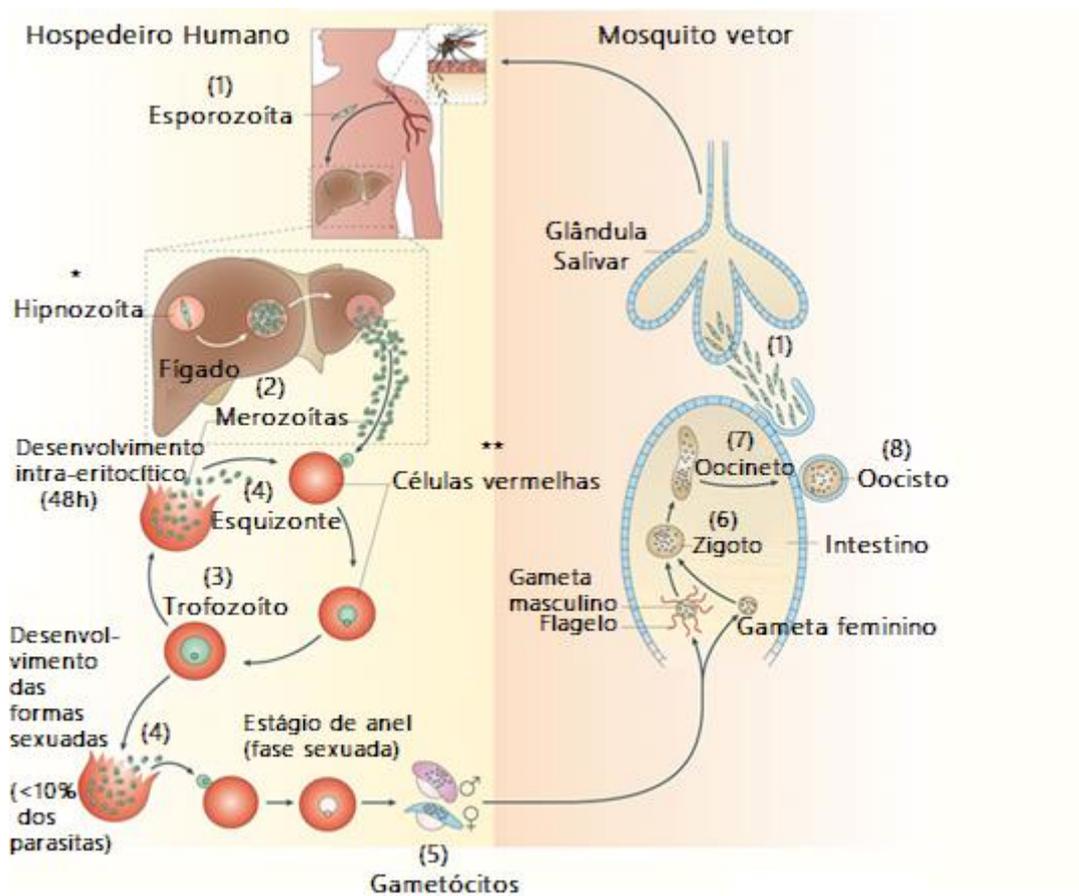
pela rede pública como pela rede privada. O investimento e melhoria dos sistemas de vigilância contribui para o correto registro e controle dos casos de malária.

### 1.1 CICLO DE VIDA DO *Plasmodium spp*

O *Plasmodium spp* possui um complexo ciclo de vida, no hospedeiro humano tem início pela introdução das formas esporozoítas do parasita através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles spp* infectado, dando início assim à transmissão da doença (Figura 2). Após a transmissão, parte dos esporozoítas migra para o fígado invadindo as células hepáticas, denominadas hepatócitos, dando início ao estágio pré-eritrocítico da infecção por malária. Nesse estágio parte da carga parasitária pode entrar em estado de latência na forma hipnozoíta, sendo este fenômeno observado na infecção pelo *P. vivax* e *P. ovale*, ou dar continuidade a seu ciclo transformando-se em esquizonte (WHITE; IMWONG, 2012). Evidências experimentais demonstram que o esquizonte, evolui para forma de merossoma, o qual apresenta um mecanismo de escape muito singular, silenciando a infecção e permitindo a liberação das formas merozoítas na corrente sanguínea (PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006). Os merozoítas iniciam o ciclo eritrocítico do parasita, ou fase sanguínea assexuada, invadindo as hemácias (no caso do *P. vivax*, os reticulócitos), e multiplicando-se por esquizogonia (JOSLING; LLINÁS, 2015). Por parasitar apenas reticulócitos, *P. vivax* têm sua cultura *in vitro* limitada, diferente de *P. falciparum* que tem seu sistema de cultura muito bem estabelecido (ROOBSOONG, 2015). Durante a esquizogonia cada célula parasitada pode dar origem a novas formas assexuadas ou ainda a formas sexuadas do parasita, conhecidas por gametócitos (BAKER, 2010). Os gametócitos são parasitas maduros com diferenciação sexual que se concentram nos capilares sanguíneos do indivíduo infectado pela malária. O desenvolvimento do ciclo do gametócito ocorre no hospedeiro invertebrado, quando o mosquito fêmea do gênero *Anopheles spp* se alimenta do sangue humano infectado, sendo esse processo denominado repasto sanguíneo.

Durante o repasto sanguíneo, o hospedeiro invertebrado quando busca alimentar-se de sangue humano infectado, ingere os gametócitos presentes nos capilares sanguíneos. Os gametócitos então migram para o intestino do mosquito, e lá cada gametócito masculino dá origem a oito microgametas, enquanto o gametócito feminino passa pelo

processo de maturação dando origem a um macrogameta. Os microgametas são flagelados e isto confere motilidade possibilitando o encontro do microgameta com o macrogameta (JOSLING; LLINÁS, 2015). Do encontro entre microgameta e macrogameta ocorre a fusão das formas sexuadas, dando origem ao zigoto diplóide. O zigoto se transforma em oocineto e esta forma deixa a luz do intestino atravessando o epitélio. No interior dos oocistos, ciclos sucessivos de replicação dão origem às formas esporozoítas, a maturação destas formas é dependente de altas temperaturas (PHILLIPS et al., 2017). Quando maduras, as formas esporozoítas migram para glândula salivar tornando-se aptas para infectar o hospedeiro humano (BAKER, 2010; PHILLIPS et al., 2017).



**Figura 2: Ciclo de vida do *Plasmodium* spp.** (1) esporozoíta, (2) merozoíta, (3) trofozoíta, (4) esquizonte, (5) gametócito, (6) zigoto, (7) oocineto, (8) oocisto. \* Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* nesse estágio, o parasita pode entrar no estado de latência, na forma de hipnozoítas. \*\* Na infecção por *P. vivax* a célula infectada é o reticulócito. Adaptado de: (JOSLING; LLINÁS, 2015).

## 1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA

A malária apresenta-se como uma doença febril aguda, com período de incubação que pode variar de acordo com a espécie de *Plasmodium*. A crise aguda por malária ou paroxismo malárico caracteriza-se pela presença de picos febris intermitentes, sudorese e episódios de calafrio. Num intervalo que dura cerca de 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*. Na infecção por *P. malariae*, o intervalo entre os picos febris pode chegar a 72 horas. Manifestações como cefaleia, náuseas e vômito também têm sido relatados. (ASHLEY; PYAE PHYO; WOODROW, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010, 2017; PHILLIPS et al., 2017).

Como exposto antes, as espécies *P. vivax* e *P. ovale* podem permanecer latentes durante o estágio de infecção do hepatócito, como hipnozoítas. Essas formas são responsáveis pelos episódios de recaída da malária que ocorrem após períodos variáveis, em média dentro de 3 a 9 semanas, mas pode ocorrer meses ou anos após o tratamento para a maioria das cepas de *P. vivax* (FERREIRA; CASTRO, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; PHILLIPS et al., 2017). Em indivíduos com histórico de múltiplas infecções por diferentes cepas do parasita, um estado de imunidade parcial à doença é observado, uma vez que os indivíduos frequentemente apresentam um quadro subclínico ou assintomático da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; PHILLIPS et al., 2017).

Dentre as espécies de plasmódio, o *P. falciparum* é o mais virulento, sendo responsável pela grande maioria das mortes. Indivíduos primoinfectados, gestantes e crianças menores de 5 anos de idade apresentam uma maior chance de evoluir para formas graves da doença. São sinais de malária grave e complicada: hipertermia (temperatura > 41°C), convulsão, hiperparasitemia (>200.000/mm<sup>3</sup>), vômitos repetidos, oligúria, dispnéia, anemia intensa, icterícia, hemorragias e hipotensão arterial. Podendo também ocorrer alteração de consciência, delírio e coma (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; PHILLIPS et al., 2017).

### 1.3 UTILIZAÇÃO DE VACINAS NO COMBATE A MALÁRIA

O cenário atual do desenvolvimento de vacinas contra a malária contempla dezenas de candidatas em fase de estudos pré-clínicos e algumas em fase de estudos clínicos. A formulação em estágio mais avançado é baseada na Proteína Circumsporozoita de *P. falciparum* (PfCSP). Recentemente, foi aprovado um programa piloto de implementação da vacina em três países da região da África subsaariana (Gana, Quênia e Malawi), com previsão de início ainda para este ano de 2018. Essa vacina, desenvolvida pela indústria farmacêutica Glaxo-SmithKline Inc. (GSK) foi registrada com o nome Mosquirix™ (anteriormente RTS,S AS01) (THE RTS, 2014; WHO, 2017b). Trata-se de uma proteína quimérica contendo as porções central e C-terminal da PfCSP fusionada à superfície do antígeno S do vírus da Hepatite B (HBsAg), formulada com um robusto sistema de adjuvante (AS), contendo Monofosforil Lipídeo A (MPLA, uma forma não tóxica do LPS) e QS21 (saponina purificada da *Quillaja saponaria*). Após estudos clínicos de fase 3 em áreas endêmicas na África, a vacina mostrou ser capaz de proteger bebês e crianças em 28% dos casos, após 3 doses vacinais, e 36% após 4 doses vacinais (AGNANDJI et al., 2011, 2012; CLEMENS; MOORTHY, 2016).

Outra vacina que obteve excelentes resultados de eficácia em testes no homem, é a PfSPZ, a qual é baseada no esporozoíta de *P. falciparum* atenuado, a partir da irradiação por raios gama. Essa vacina foi capaz de induzir 100% de proteção em indivíduos adultos do Mali, após o desafio com parasita homólogo (SEDER et al., 2013).

O desenvolvimento de vacinas contra as formas sanguíneas do parasita poderia representar um importante passo rumo à eliminação dos sintomas e agravos da doença bem como, a interrupção do ciclo do parasita. Em sua maior parte, os antígenos de estágios sanguíneos assexuados estudados e caracterizados, encontram-se na superfície do merozoíta. As Proteínas de Superfície do Merozoíta (MSPs) estão entre as mais estudadas, visando o desenvolvimento de vacinas de subunidades, dentre estas destacam-se PfMSP1, PfMSP2, PfMSP3 (DRAPER et al., 2015; GOOD; MILLER, 2018; SIRIMA; COUSENS; DRUILHE, 2011), PfAMA-1 e PfRON2 (KUSI et al., 2011b; REMARQUE et al., 2008; SRINIVASAN et al., 2011). Ainda no estágio sanguíneo as formas sexuadas também são alvos vacinais, tendo como foco principal a inibição da gametogênese e bloqueio da transmissão da doença. Entre os antígenos estudados, destacam-se os candidatos Pfs25, Pfs230, Pfs45, Pfs48 e PfEMP1 (ACQUAH et al., 2017;

DATTA et al., 2017; DRAPER et al., 2015; DZIKOWSKI; FRANK; DEITSCH, 2006; FRIED; DUFFY, 2015; THOMPSON et al., 2018).

Por outro lado, as pesquisas visando o desenvolvimento de vacina contra o *P. vivax*, têm recebido menos atenção. Na fase pré-eritrocítica, assim como em *P. falciparum*, o principal candidato a vacina é o antígeno CS de *P. vivax* (PvCS). Recentemente, nosso grupo publicou dois trabalhos utilizando proteínas recombinantes baseadas na PvCSP. Recentemente, o nosso grupo demonstrou que proteínas recombinantes representando os diferentes alelos da proteína PvCSP, assim como um polipeptídeo híbrido nomeado como PvCSP-All foram geradas e obtidas a partir da expressão em *Pichia pastoris*, após a obtenção e caracterização do produto obtido, camundongos da linhagem C57BL/6 foram imunizados com as formulações vacinais na presença do adjuvante Poly(I:C). A partir da imunização, foram observados altos títulos de anticorpos gerados contra todos os alelos. Os animais imunizados apresentaram proteção após desafio com formas esporozoítas de *Plasmodium berghei* expressando em sua superfície os *repeats* de PvCSP (GIMENEZ et al., 2017).

Mais recentemente, foram utilizadas duas proteínas quiméricas expressas em leveduras *Pichia pastoris*. A primeira construção denominada yPvCSP-All<sub>FL</sub> contendo a fusão das três regiões *repeats* (VK210, VK247 e vivax-like) adicionados das porções N e C terminal da proteína CS, e a segunda, denominada yPvCSP-AllCT contendo a fusão das três regiões *repeats* e a porção C terminal da proteína CS. Os camundongos foram imunizados com três doses vacinais de yPvCSP na presença dos adjuvantes Poly(I:C) ou Montanide ISA 720. Em um segundo experimento, previamente ao regime vacinal os animais foram expostos a vetores adenovírus de replicação deficiente expressando CSP de sorotipo 5 humano (AdHu5) e sorotipo 68 de chimpanzé (AdC68), após a exposição os animais receberam 2 doses vacinais contendo yPvCSP na presença do adjuvante Poly(I:C). Ambas as formulações utilizadas quando desafiadas por parasitas transgênicos expressando a sequência de *repeats* da proteína CS de *P. vivax* na sua superfície foram capazes de atrasar o aumento da parasitemia observadas no modelo de infecção animal (DE CAMARGO et al., 2018).

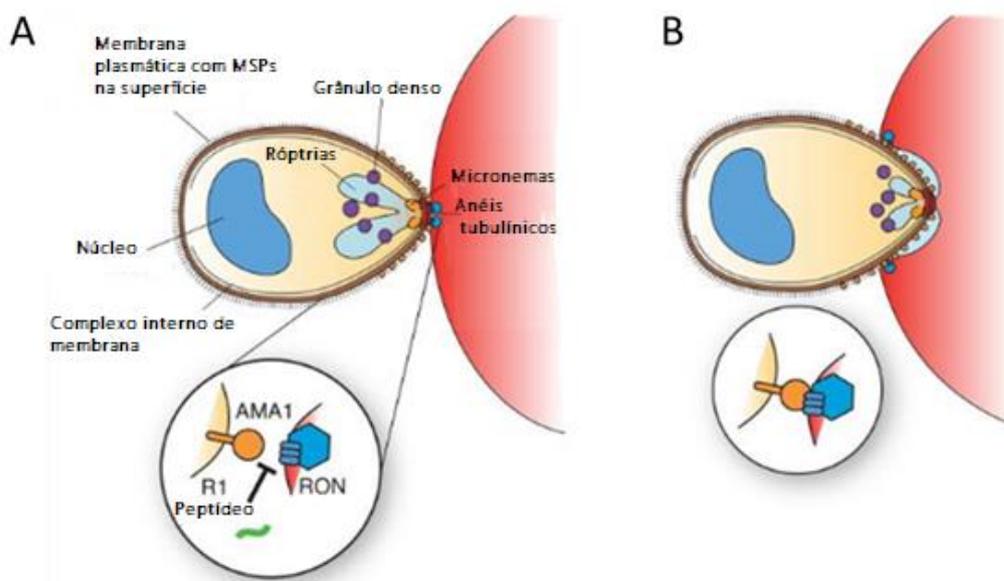
Além das formulações descritas acima, têm sido propostas estratégias semelhantes à vacina RTS,S para o *P. falciparum*, baseadas na obtenção de *Virus Like Particule* (VLP). Neste contexto, uma candidata promissora é a vacina Rv21, que combina o antígeno S do vírus da Hepatite B (HBsAg), ao antígeno de PvCSP. Recentemente, um

estudo em camundongos demonstrou que essa proteína quimérica emulsificada com um adjuvante derivado de saponina, o Matrix-M, foi capaz de induzir 100% proteção, em ensaio com desafio homólogo, utilizando parasita transgênico Pb/Pv (SALMAN et al., 2017).

Alguns antígenos da fase sanguínea assexuada (merozoítas) de *P. vivax* têm sido explorados como candidatos a vacina, sendo os principais os seguintes: MSP-1, AMA-1 e DBP (BABON et al., 2007; BARGIERI et al., 2008; BHARDWAJ et al., 2015; BITENCOURT et al., 2013; CRAWFORD et al., 2010; ELIAS et al., 2014; GUY et al., 2018; JIANG et al., 2013; MAIGA et al., 2013; ROCHA et al., 2017). Já na fase sanguínea sexuada os estudos envolvem os antígenos Pvs25, Pvs45, Pvs48 e Pvs230 (BLAGBOROUGH et al., 2016; TACHIBANA et al., 2012; VALLEJO et al., 2016).

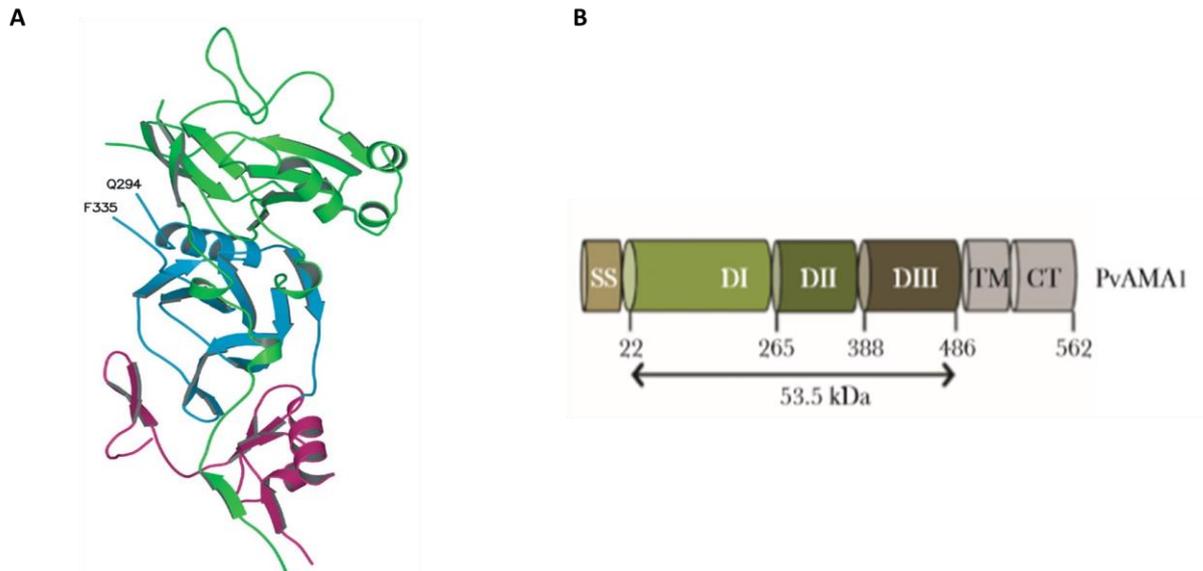
#### **1.4 ANTÍGENO 1 DE MEMBRANA APICAL (AMA-1)**

A proteína AMA-1 (Antígeno 1 de Membrana Apical) de *Plasmodium* é uma proteína transmembrana altamente conservada (REMARQUE et al., 2008), que possui ortólogos em pelo menos duas espécies do filo Apicomplexa: *Babesia bovis* (MONTERO et al., 2008) e *Toxoplasma gondii* (CRAWFORD et al., 2010). Em *Plasmodium*, AMA-1 encontra-se inicialmente presente nos micronemas e, posteriormente, na superfície das formas merozoítas (REMARQUE et al., 2008). Inicialmente, a função biológica da proteína AMA-1 foi proposta a partir de um estudo que encontrou uma evidência genética que sugere seu envolvimento no processo de fixação nos eritrócitos (COMBE et al., 2009). Mais tarde estudos aprofundaram o entendimento do seu envolvimento no processo de fixação das células vermelhas foi observado que AMA-1 atua em conjunto com outra proteína a RON, proteína secretadas das rôptrias (Figura 3). (DELGADILLO et al., 2016; RICHARD et al., 2010; SRINIVASAN et al., 2011).



**Figura 3: Modelo representativo da função da proteína AMA-1 durante a invasão da célula sanguínea.** A) O ancoramento do merozoíto após a etapa de reorientação, em destaque a formação do complexo AMA1-RON. B) O processo de invasão do merozoíto, em destaque o complexo AMA1-RON. Adaptado de (RICHARD et al., 2010)

Estruturalmente a proteína AMA-1 contém um ectodomínio rico em cisteínas, subdividido em domínios I, II e III, um domínio transmembrana e uma região citoplasmática (CHESNE-SECK et al., 2005). A estrutura tridimensional da proteína AMA-1 de *P. vivax*, foi elucidada utilizando-se uma proteína recombinante baseada no ectodomínio de inteiro de PvAMA-1 (cepa Sal-I), expressa em *Pichia pastoris*, a qual confirmou a conformação inicial sugerida a partir da análise da estrutura primária desta proteína. A estrutura da proteína consiste de três domínios, com 16 resíduos de cisteína, formando 8 pontes dissulfeto. As pontes dissulfeto formadas pelos resíduos de cisteína promovem a separação do ectodomínio em domínios denominados I, II e III (PIZARRO et al., 2005) (Figura 4). Dois destes domínios I e II, contam com a presença de módulos “PAN”. Os módulos PAN formam *loops* que se estendem pelo domínio da proteína e servem de suporte para inúmeros resíduos polimórficos. Esta forma de adaptação sugere como o parasita da malária introduziu a variabilidade encontra na proteína AMA-1 (BAI et al., 2005; PIZARRO et al., 2005)



**Figura 4: Estrutura cristal e representação esquemática da proteína PvAMA-1.** A) Estrutura cristalográfica da proteína AMA-1 de *P. vivax*, onde em verde representa-se o domínio I, em azul o domínio II e em roxo o domínio III, fonte (PIZARRO et al., 2005). B) Predição estrutural da proteína PvAMA-1, SS - Peptídeo sinal, DI - domínio I, DII – domínio II, DIII – domínio III, TM – região transmembrana, CT – região citoplasmática, adaptado de (DREW et al., 2018).

Diversos trabalhos têm descrito o polimorfismo de genes que codificam a proteína em diferentes isolados naturais do parasita, tanto em *P. falciparum* como em *P. vivax* (ARNOTT et al., 2014; REMARQUE et al., 2008). Estes estudos são importantes e devem ser levados em consideração quando se considera um candidato a vacinação. Recentemente uma formulação vacinal contra AMA-1 de *P. falciparum* utilizando a abordagem multi-alélica apresentou ser segura e eficaz em ensaio clínico de fase 1, visando avaliar a segurança e a imunogenicidade desta vacina (SIRIMA et al., 2017). Nos últimos anos, estudos de comparação da sequência de nucleotídeos de AMA-1 de *P. vivax*, utilizando diferentes cepas do parasita, demonstraram o polimorfismo do gene que codifica a proteína, dados que corroboram com os achados de diversidade encontrado nas proteínas AMA-1 de *P. falciparum* (REMARQUE et al., 2008).

Em relação as propriedades imunogênicas de PvAMA-1, previamente demonstramos que proteínas recombinantes foram altamente reconhecidas por soro de indivíduos da área endêmica no Brasil (CASALE, 2013; MORAIS et al., 2006; MÚFALO et al., 2008; PEREIRA, 2012; ROCHA et al., 2017; RODRIGUES et al., 2005;

VICENTIN et al., 2014). Além disso, nosso grupo avaliou a imunogenicidade de PvAMA-1 utilizando diferentes protocolos de imunização que incluíram estratégias de indução e reforço homólogos e heterólogos com DNA plasmidial (D) e proteína recombinante (P), emulsificada na presença de diferentes adjuvantes (VICENTIN et al., 2014). Os autores observaram que a proteína recombinante induziu altos títulos de anticorpos, principalmente quando utilizaram os adjuvantes saponina Quil A e Adjuvante Incompleto de Freund (AIF). Além disso, a proteína PvAMA-1 recombinante foi produzida em condições de boas práticas de laboratório (BPL), a qual foi obtida com elevado rendimento e pureza, baixos níveis de endotoxina, ausência de contaminantes microbianos e reproduziu os resultados das imunizações experimentais da proteína expressa no laboratório de pesquisa. Os anticorpos produzidos foram capazes de reconhecer a proteína nativa obtidas em ensaio *in vitro* a partir de amostras de sangue de indivíduos infectados por malária na Ásia e também inibiram a reinvasão *ex vivo* (VICENTIN et al., 2014).

Mais recentemente, o grupo produziu uma proteína quimérica composta pelo ectodomínio de AMA-1 fusionado à região C-terminal (19 kDa) imunodominante da Proteína 1 da Superfície do Merozoíta (MSP-1) de *P. vivax* (PvAMA<sub>166</sub>-MSP1<sub>19</sub>). Esta proteína foi utilizada em solução com o adjuvante Poly(I:C) em imunizações utilizando camundongos BALB/c e C57BL/6. A imunização com esta proteína quimérica induziu altos títulos de anticorpos em ambas linhagens de camundongos e os anticorpos gerados reconheceram a proteína nativa de esquizontes maduros de isolados asiáticos de *P. vivax* (ROCHA et al., 2017).

A utilização de proteínas recombinantes é uma excelente estratégia para o estudo dos diferentes alelos de PvAMA-1 e o impacto do polimorfismo dessa proteína no desenvolvimento de uma vacina universal contra *P. vivax*. Arnott e colaboradores (2013) reforçaram a necessidade de se utilizar formulações vacinais com os diferentes alelos de PvAMA-1 após um estudo com sequências de 373 genes dessa proteína oriundos de diferentes partes do mundo. Esses autores destacaram a importância da utilização de formulações vacinais que avaliem a relação entre os diferentes alelos e a capacidade imunogênica de cada alelo. Assim, no presente trabalho buscamos analisar a imunogenicidade de seis novas variantes alélicas baseadas na PvAMA-1, selecionadas a partir do estudo de Arnott e colaboradores (2013) As variantes são: PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-Sal-I, PvAMA-1-Chesson-I, PvAMA-1-SK081-apical, PvAMA-1-Indonesia-

XIX, PvAMA-1-PNG\_62\_MU, isoladas e em combinação equimolar em solução com o adjuvante Poly(I:C).

### 1.5 ADJUVANTE POLY(I:C)

Por conceito, vacinas baseadas em proteínas recombinantes requerem a entrega de antígenos juntamente com um imunostimulante, adjuvante, que levará há uma resposta imune mais intensa e de maior longevidade (DRAPER et al., 2015). A indução da resposta imune humoral e celular, sem apresentar reações adversas ou com reação adversa aceitável faz parte das funções esperadas para um bom adjuvante.

No presente estudo, a imunogenicidade das proteínas recombinantes foi avaliada na presença do adjuvante ácido poli-inosínico-poli-citidílico de elevada massa molecular Poly (I:C) HMW. Poly (I:C) corresponde a um análogo sintético de RNA de dupla cadeia (dsRNA), atua como agonista de receptores TLR3, tanto dsRNA natural como o sintético são conhecidos pela indução de interferon do tipo 1 (IFN) e estimulam a produção de outras citocinas (ALEXOPOULOU et al., 2001). Poly (I:C) tem sido empregado em testes de vacinas contra câncer, e doenças infecciosas (HEIDENREICH et al., 2015; POYNTER; DEWITTE-ORR, 2018; TRUMPFHELLER et al., 2012). Nosso grupo já demonstrou em estudos anteriores que a utilização do Poly (I:C) induz a produção de anticorpos contra proteínas recombinantes baseadas em antígenos de *P. vivax* (CASALE, 2013; GIMENEZ et al., 2017; LIMA, 2014; PEREIRA, 2012; ROCHA et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2014).

Uma vez que o Poly (I:C) é reconhecido pelo sistema imune, TLR3 ativa a transcrição do fator interferon regulatório 3 (IRF3), a ativação de IRF3 leva a produção de interferons tipo 1 (IFN), especialmente IFN- $\beta$  (YAMAMOTO et al., 2003). Outra via de ativação envolve o recrutamento de TNF receptor associado fator 6 (TRAF6) ou o receptor de interação proteína 1 (RIP1), com a subsequente ativação dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B. A ativação desta via leva a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas (KAWAI; AKIRA, 2008). Por apresentar o mecanismo descrito como um diferencial, Poly (I:C) é um bom adjuvante na composição das formulações vacinais, como já demonstrado nos ensaios pré-clínicos.

## ***OBJETIVOS***

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Gerar novas proteínas recombinantes representando diferentes formas alélicas da proteína AMA-1 de *P. vivax* a fim de avaliar o impacto do polimorfismo de AMA-1 na indução de anticorpos contra estas proteínas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Expressar e purificar as proteínas recombinantes, PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-Sal-I, PvAMA-1-Chesson-I, PvAMA-1-Indonesia-XIX, PvAMA-1-PNG\_62\_MU e PvAMA-1-SK0814-apical, representando diferentes formas alélicas de AMA-1 de *P. vivax* como proteínas solúveis expressas a partir da levedura *Pichia pastoris*;
- II. Analisar a estrutura secundária das novas proteínas recombinantes;
- III. Avaliar comparativamente a resposta imune humoral (IgG total) induzidas em camundongos após a vacinação com as novas proteínas PvAMA-1 isoladas ou em combinação equimolar utilizando protocolo homólogo de indução e reforço na presença do adjuvante Poly(I:C);
- IV. Avaliar a especificidade dos anticorpos obtidos a partir da vacinação de camundongos com as novas proteínas PvAMA-1 utilizando protocolo homólogo de indução e reforço na presença do adjuvante Poly(I:C).

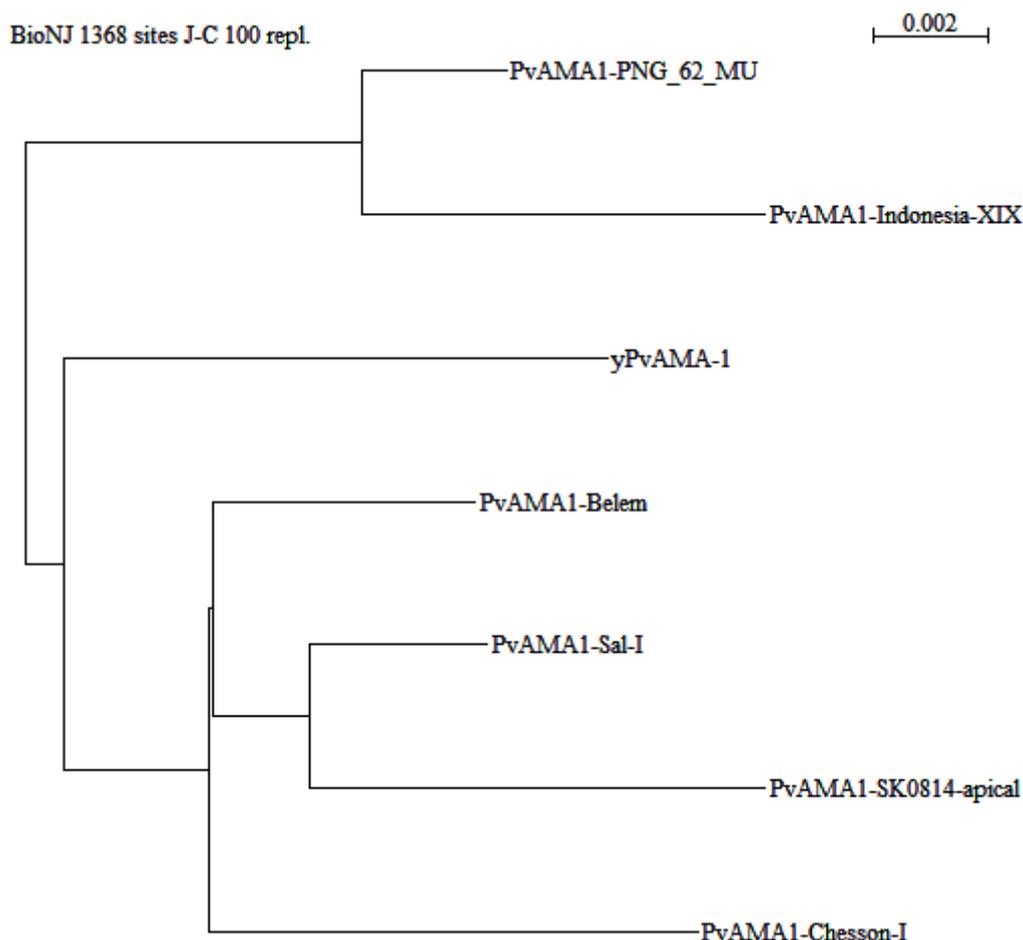
## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

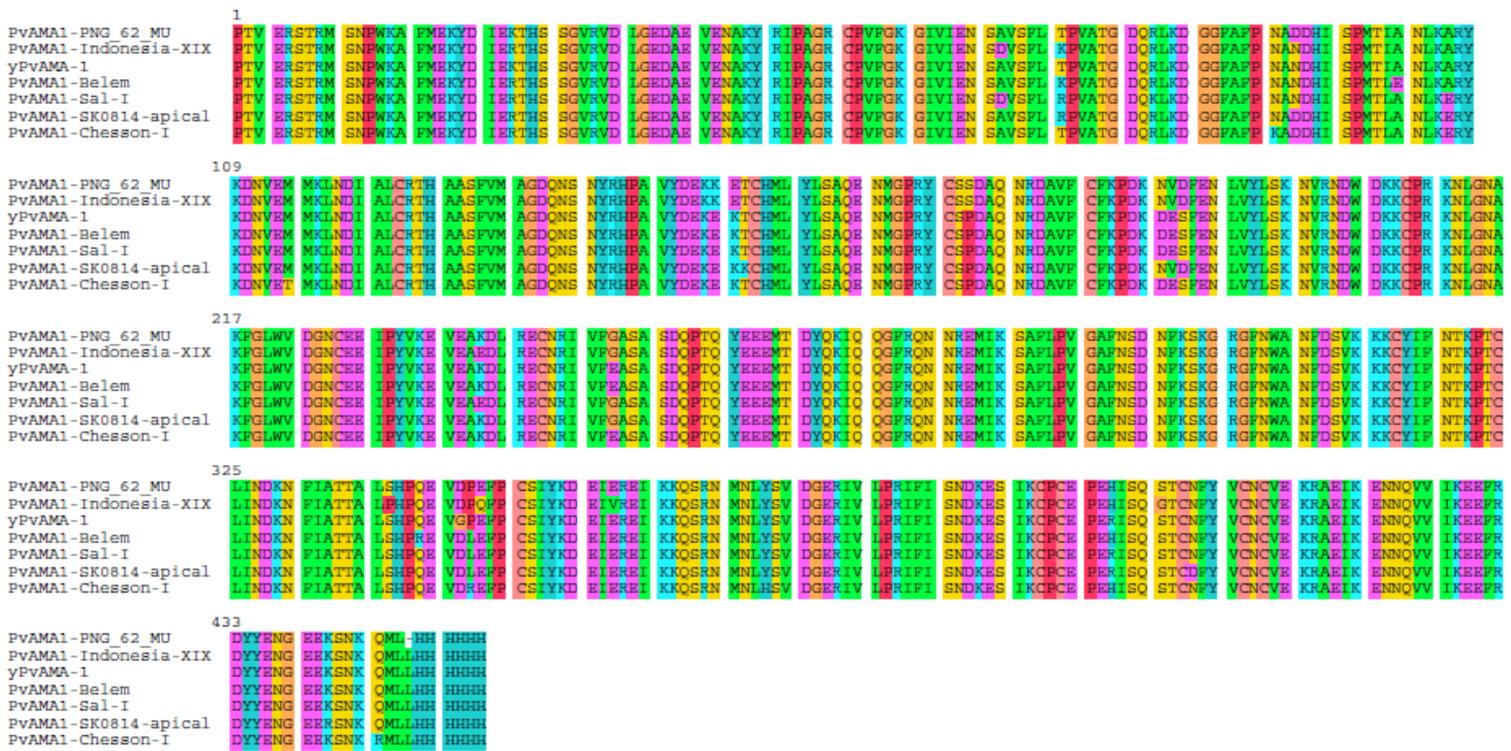
#### 3.1 GENES SINTÉTICOS PvAMA-1

Os genes sintéticos que codificam as novas sequências PvAMA-1 em suas diferentes formas alélicas foram construídos com base em sequências selecionadas a partir do estudo de população de PvAMA-1 que diz respeito a sequência do gene e o polimorfismo observado nas áreas onde o parasita se distribui (ARNOTT et al., 2013). Com base no trabalho mencionado, os seguintes genes foram selecionados para utilização no presente estudo: Sal-1 (Genbank XM\_001615397); Belem (Genbank EU395595); Indonesia-XIX (Genbank EU395598); SK0814-apical (Genbank GU476488); Chesson-I (Genbank EU395596); e PNG\_62\_MU (Genbank KC702493). As proteínas recombinantes possuem em seu interior o ectodomínio inteiro de PvAMA-1, composto dos domínios 1, 2 e 3. A esta sequência foi adicionada uma cauda de hexa histidina na região C-terminal. Os genes sintéticos foram obtidos comercialmente (GenScript USA Inc, Piscataway, NJ), com códons otimizados para expressão em levedura *Pichia pastoris*. Para efeito de comparação com as novas construções, foi utilizada a sequência de aminoácidos da proteína PvAMA-1-Sal-I (Genbank XM\_001615397). No presente trabalho, utilizamos a proteína yPvAMA-1 (Genbank KJ010958) previamente estudada pelo grupo como controle no ensaio de avaliação da imunogenicidade (VICENTIN et al., 2014). Para efeito comparativo das diferentes sequências, foi aplicado o método de análise de distâncias BioNJ, utilizando o programa Seaview (versão 4) (Figura 05), para predição filogenética (GOUY; GUINDON; GASCUEL, 2010). O alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente a cada uma das proteínas PvAMA-1 com adição da proteína yPvAMA-1 foi realizado a partir da ferramenta Muscle algoritmo v3.8.31 utilizando o programa Seaview v4, (Figura 06) (EDGAR, 2004). Os genes otimizados correspondentes as novas proteínas PvAMA-1, foram subclonados no vetor pPIC9K (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc., Waltham, MA) (Figura 7), os quais foram denominados pPIC9K-PvAMA-1-Sal-1, pPIC9K-PvAMA-1-Belem, pPIC9K-PvAMA-1-PNG\_62\_MU, pPIC9K-PvAMA-1-Indonesia-XIX, pPIC9K-PvAMA-1-SK0814-apical, e pPIC9K-PvAMA-1-Chesson-I. Cada plasmídeo foi transformado em bactérias *E. coli* linhagem DH5- $\alpha$  (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) a fim de se obter a expansão clonal. O DNA obtido por lise

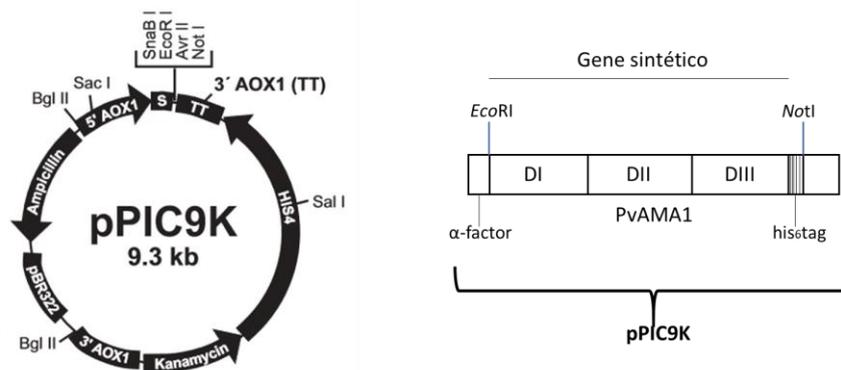
alcalina foi quantificado por análise espectrofotométrica em NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific USA Inc.) e teve a integridade dos sítios enzimáticos confirmada por meio da análise de restrição utilizando as enzimas SalI, EcoRI e NotI (New England Biolabs USA Inc.). A integridade das sequências foi confirmada através de sequenciamento prévio realizado pela Genscript.



**Figura 5:** A relação filogenética entre as novas sequências PvAMA-1 com adição do gene que corresponde a proteína yPvAMA-1 utilizada no presente estudo como controle na avaliação da imunogenicidade das novas proteínas PvAMA-1. A relação filogenética das sequências PvAMA-1 foi obtida através da análise de distâncias BioNJ utilizando o programa Seaview (versão 4)(GOUY; GUINDON; GASCUEL, 2010).



**Figura 6:** Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondentes as proteínas PvAMA-1. As sequências PvAMA-1-PNG\_62\_MU, PvAMA-1-Indonesia-XIX, PvAMA-1-Chesson-I, PvAMA-1-SK0814-apical, PvAMA-1-Sal-I, PvAMA-1-Belem e yPvAMA-1 foram alinhadas a partir da ferramenta Muscle algoritmo v3.8.31 utilizando o programa Seaview v4 (EDGAR, 2004). Os *gaps* são representados por (-).



**Figura 7: Representação esquemática da estrutura geral do gene sintético PvAMA-1 subclonado no vetor pPIC9K.** Barra azul: os sítios para as enzimas de restrição EcoRI (5') e NotI (3'); em cinza os domínios I, II e III que compõem a proteína PvAMA-1, após e anterior ao sítio de restrição NotI a cauda de histidina (his<sub>6</sub>tag) acrescentada à proteína recombinante.

### 3.2 TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS

Para transformação dos plasmídeos em levedura *P. pastoris*, linhagem GS115 (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) foram utilizados 40  $\mu$ g dos plasmídeos pPIC9K contendo as sequências de PvAMA-1 previamente digeridos com a enzima de restrição SalI (New England Biolabs USA Inc.) e precipitados de acordo com a instrução do fabricante (INVITROGEN, [s.d.]). Após incubação a 37°C entre 16-18h, a precipitação do DNA foi realizada adicionando-se a cada tubo de digestão dois volumes de etanol absoluto (álcool etílico) [Merck KGaA DEU Inc, Darmstadt, HE], incubando a -20°C entre 16-18h. Ao fim deste procedimento, o material foi centrifugado a 15093 x g a 4°C durante 15 minutos e o sedimento obtido foi lavado com 500  $\mu$ L de etanol 70% em água (v/v) à temperatura de -20°C, e então centrifugado novamente nas mesmas condições já descritas. Após isto, a secagem do sedimento ocorreu à temperatura ambiente (T.A., ~25°C). O mesmo material, após a secagem, foi solubilizado em 10  $\mu$ L de água MiliQ estéril (Millipore, Merck KGaA DEU Inc.).

Uma colônia de levedura *P. pastoris*, linhagem GS115 (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) foi inoculada em 5 mL de meio YPD [1% (m/v) de

extrato de levedura (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.), 2% (m/v) peptona (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) e 2% (m/v) glicose (Fluka, Sigma-Aldrich USA Co. LLC, St. Louis, MO)], sendo posteriormente incubada à temperatura de 28-30°C entre 16-18h sob agitação constante de 200 RPM. Após saturação, 400 µL desta pré-cultura foi inoculada em 500mL de meio YPD. Novamente a cultura foi incubada nas condições anteriores já descritas, até atingir a densidade óptica a 600nm (D.O.600) de 1,3 – 1,5 quando foi submetida à centrifugação a 4°C a 2.465 g por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular lavado duas vezes com 250mL de água MiliQ estéril, 4°C, e 1 vez com 20mL de D-Sorbitol 1M estéril (Sigma-Aldrich USA Co. LLC) a 4°C. Ocorreu então uma última centrifugação e as células, agora competentes, foram solubilizadas em 500µL de D-Sorbitol 1M estéril a 4°C.

Para transformação efetiva, 80µL de células competentes foram misturadas a 40µg de DNA linearizado, sendo tal procedimento realizado para cada um dos plasmídeos, os quais foram também purificados e solubilizados em 10µL de água MiliQ. As células foram transferidas para uma cubeta estéril de 0,2 cm (Bio-Rad Laboratories USA Inc., Hercules, CA) a -20°C, e incubadas no gelo por 5 minutos. A cubeta foi submetida a um pulso de 1.500 V (voltagem), 200 Ω (resistência) e 25 F (capacitância) no eletroporador Gene Pulser/Micro Pulser (Bio-Rad Laboratories USA Inc.). Imediatamente após o pulso foi adicionado 1mL de D-Sorbitol 1M estéril, 4°C.

### **3.3 SELEÇÃO DOS CLONES TRANSFORMANTES**

Após o procedimento descrito, as células foram semeadas em MD ágar [meio mínimo contendo glicose 2% (v/v) sem histidina], e as leveduras transformantes His+Mut+ foram obtidas três dias após incubação das placas a 30°C. O vetor pPIC9K possui diferentes sítios de clivagem, para cada estratégia de integração, assim a integração do genoma exógeno a levedura ocorre por recombinação homóloga dupla, uma vez que o plasmídeo (vetor) se encontra linearizado. Como no produto da digestão do plasmídeo pela enzima SalI não há substituição do gene *aox1* pelo gene *PvAMA-1* preservando o fenótipo selvagem His+Mut+. A seleção dos clones para expressão se deu pela avaliação

da resistência destes ao antibiótico Geneticina (G418, Sigma-Aldrich USA Co. LLC) em concentrações crescentes partindo de 0,5 até 6,0 mg/mL em meio YPD ágar.

### **3.4 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS PvAMA-1 EM PEQUENA E MÉDIA ESCALA**

Para expressão em pequena escala foram seguidas as orientações do pPIC9K, A Pichia Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression, guide version G (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.) e o protocolo padronizado previamente pelo grupo (VICENTIN et al., 2014). Sendo assim os clones transformados foram cultivados durante 24h à temperatura média entre 28-30°C sob agitação constante a 230 RPM, em 5 mL de meio BMGY [1% (m/v) de extrato de levedura, 2% (m/v) peptona, 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Synth, Labsynth Produtos para Laboratório BRA Ltda., Diadema, SP), 0,34% (m/v) base nitrogenada de levedura (Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.), 1% (m/v) sulfato de amônio (Sigma-Aldrich USA Co. LLC), 4x10<sup>-5</sup>% (m/v) biotina (Gibco, Life Technologies Corporation USA Inc.) e 3% (m/v) glicerol (Sigma-Aldrich USA Co. LLC)]. Após 24h as células foram recolhidas por centrifugação a 2.465 g durante 5 minutos à temperatura ambiente e solubilizadas em 10 mL de meio BMMY [1% (m/v) de extrato de levedura, 2% (m/v) de peptona, 100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,34% (m/v) de base nitrogenada de levedura, 1% (m/v) de sulfato de amônio, 4x10<sup>-5</sup>% (m/v) de biotina e 0,5% (v/v) de metanol (álcool metílico, Merck KGaA DEU Inc.)], sendo posteriormente cultivadas por mais 72h, com indução por meio da adição de metanol na concentração final de 1% a cada 24h de manutenção da cultura. Após a verificação da expressão de PvAMA-1 por meio de gel SDS-PAGE 12% corado com azul de coomassie, o clone His+Mut+ de cada PvAMA-1 selecionado foi submetido a diferentes condições de expressão afim de otimizar sua expressão.

Para estabelecer a melhor condição de expressão para cada clone selecionado, cada um foi submetido à variação do volume de meio indutor (BMMY) em relação ao volume de meio repressor (BMGY) em 50%, 100% e 200%, com o tempo de duração do cultivo após o início da indução de 24 a 96h e o volume de indutor (metanol) utilizado entre 0,5-2,0%.

Para expressão das proteínas em média escala, cada clone selecionado foi cultivado durante 24 horas à temperatura média entre 28-30°C, sob agitação constante a 200 RPM, em 500 mL de meio contendo 1% de glicerol (BMGY). Após este período, as células foram recolhidas por centrifugação a 189 x g, durante 5 minutos, a temperatura ambiente, após solubilizadas em 500 mL de meio contendo 1% de metanol (BMMY) e cultivadas durante 5 dias. A manutenção da indução do meio foi realizada através de indução diária de metanol na concentração final entre 0,5 a 2%, conforme o valor estabelecido para expressão de cada clone em pequena escala. Após o período de cultivo, a presença de proteína no sobrenadante foi analisada por meio de gel SDS-PAGE na concentração de 12% corado com azul de coomassie. O sobrenadante contendo proteína, foi submetido a filtração a vácuo, utilizando membrana 0.22µm (Millipore, Merck KGaA DEU Inc.).

### **3.5 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PvAMA-1**

O sobrenadante filtrado, contendo proteína foi submetido a purificação por afinidade através de coluna de Ni<sup>2+</sup> HisTrap Q Crude (GE Life Sciences), acoplada ao sistema Äkta (GE Life Sciences), previamente equilibrada em solução contendo 20mM de fosfato de sódio, pH 8,0, 0,5M NaCl. A proteína foi eluída em gradiente linear entre 15 – 400mM de Imidazol (Synth), neste mesmo tampão. Após o processo descrito, as frações contendo proteína foram coletadas e analisadas por gel SDS-PAGE 12%.

As frações contendo proteína foram reunidas e submetidas a diálise em membrana própria para diálise (SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 10.000 MWCO, Thermo Fisher Scientific) contra solução contendo 20mM Tris-HCl pH 8,0. Após a diálise, a proteína passou por filtração (0,45 µm) e submetida a purificação por cromatografia de troca iônica, utilizando uma coluna HiTrap Q FF (GE Life Sciences), acoplada ao sistema Äkta (GE Life Sciences), previamente equilibrada em solução contendo 20mM Tris-HCl, pH 8,0. A proteína foi eluída em gradiente linear entre 0 – 1M NaCl, no mesmo tampão. Após o processo de purificação por troca iônica, as frações contendo proteína foram coletadas e analisadas por gel SDS-PAGE 12%.

As frações contendo proteína foram reunidas e submetidas a diálise em membrana própria para diálise (SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 10.000 MWCO, Thermo Fisher

Scientific), contra solução contendo 8mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 130mM NaCl, pH 7,4 (PBS), overnight, sob agitação constante, a temperatura de 4°C. A concentração de cada proteína utilizada no presente trabalho, foi determinada através do software ImageQuant™ (GE Life Sciences), utilizando soro albumina bovino (BSA) como padrão.

### **3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NOVAS PROTEÍNAS PvAMA-1**

As proteínas recombinantes foram caracterizadas através de SDS-PAGE 12% corado com azul de coomassie. As proteínas PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-PNG\_62\_MU, PvAMA-1-Indonesia\_XIX, PvAMA-1-SK0814-apical, PvAMA-1-Sal-I e PvAMA-1-Chesson-I, foram submetidas a ensaio *immunoblotting* [utilizando anticorpo monoclonal anti-PvAMA-1-DII (GENTIL et al., 2010)], sob condições redutoras, e dicroísmo circular (BÖHM; MUHR; JAENICKE, 1992; RAMOS, 2004; ROCHA et al., 2017; VICENTIN et al., 2014).

#### **3.6.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM DODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE)**

As eletroforeses realizadas no presente trabalho foram executadas de acordo com protocolo estabelecido pelo grupo de pesquisa onde o trabalho foi desenvolvido. Os géis de empilhamento foram obtidos a partir da utilização de 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.), 0,2% dodecil sulfato de sódio (SDS, Invitrogen Life Technologies Corporation USA Inc.)] polimerizados a partir da utilização de 0,1% (m/v) de persulfato de amônio (Sigma-Aldrich USA Co. ) e 12µL de TEMED (Invitrogen, / Life Technologies Corporation USA Inc.) para 5mL de solução final. Os géis de separação foram obtidos a partir da utilização de 12% de acrilamida/bis-acrilamida, a partir das soluções estoque [30% (m/v) acrilamida, 0,8% (m/v) de bis-acrilamida e 0,75mM Tris, 0,2% (m/v) de SDS] e polimerizados utilizando 0,1% (/v) de persulfato de amônio e 12µL de TEMED para 9mL de solução final.

As eletroforeses foram realizadas sob a seguinte condição: 140 V em solução tampão Tris-Glicina (35mM SDS, 160mM glicina (Synth, LabSynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda), 25mM Tris-HCl). Após a eletroforese, os géis foram corados em solução corante [1% (m/v) de Coomassie blue R250 (USB Affymetrix USA Inc.), 45% (v/v) de metanol (Synth, LabSynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.) e 10% (v/v) de ácido acético (Synth, LabSynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.)] e descorados em solução descorante [45% (v/v) de etanol (Synth, LabSynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.) e 10% (v/v) de ácido acético]. As alíquotas de amostra foram preparadas em tampão de amostra [2,5% (m/v) de glicerol, 4% (m/v) de SDS, 25mM 2-mercaptoetanol (Bio-Rad Laboratories USA Inc.), 12,5 mM Tris-HCl e 0,025 mM azul de bromofenol (Bio-Rad Laboratories USA Inc.), e finalmente aquecidas a 97°C por 2 minutos.

### **3.6.2 IMMUNOBLOTTING**

As novas proteínas recombinantes PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-PNG\_62\_MU, PvAMA-1-Indonesia\_XIX, PvAMA-1-SK0814-apical, PvAMA-1-Sal-I e PvAMA-1-Chesson-I, foram submetidas ao ensaio de eletroforese SDS-PAGE 12%, como descrito anteriormente. Após a eletroforese, as amostras separadas no gel de acrilamida/bis-acrilamida foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose por meio do Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack (Bio-Rad Laboratories USA Inc), utilizando o Trans-Blot® Turbo™ transfer system nas condições 1.3Ω, 25V durante 7 minutos.

A membrana foi corada em solução Ponceau-S [0,1% de Ponceau red (Bio-Rad Laboratories USA Inc.) e 10% de ácido acético] para confirmação da transferência, e em seguida foi incubada por 16-18 horas, à temperatura de 4°C, em solução de bloqueio [5% (m/v) de leite desnatado (Molico®, Nestlé Brasil Ltda.), 2,5% (m/v) de albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich USA Co.) em PBS.

Após a incubação de bloqueio, a membrana foi submetida à nova incubação por mais 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo primário anti-PvAMA-1-DII [clone K<sub>2</sub>43 1:500 (v/v)]. Ao término desta incubação, a membrana foi submetida a 3 lavagens de 10 minutos em solução PBS-Tween [0,05% de Tween 20 (v/v), Invitrogen, Life Technologies Corporation USA Inc.]. Após o procedimento de lavagem descrito

anteriormente, a membrana foi submetida a uma nova incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories USA Inc.) a diluição 1:1000 em solução de bloqueio pelo período de 1 hora à temperatura ambiente. Ao término do processo descrito, a membrana foi submetida uma última vez ao procedimento de lavagem.

A revelação por quimioluminescência, utilizando o 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.

### **3.7 ANÁLISE DA IMUNOGENICIDADE EM CAMUNDONGOS**

#### **3.7.1 ANIMAIS**

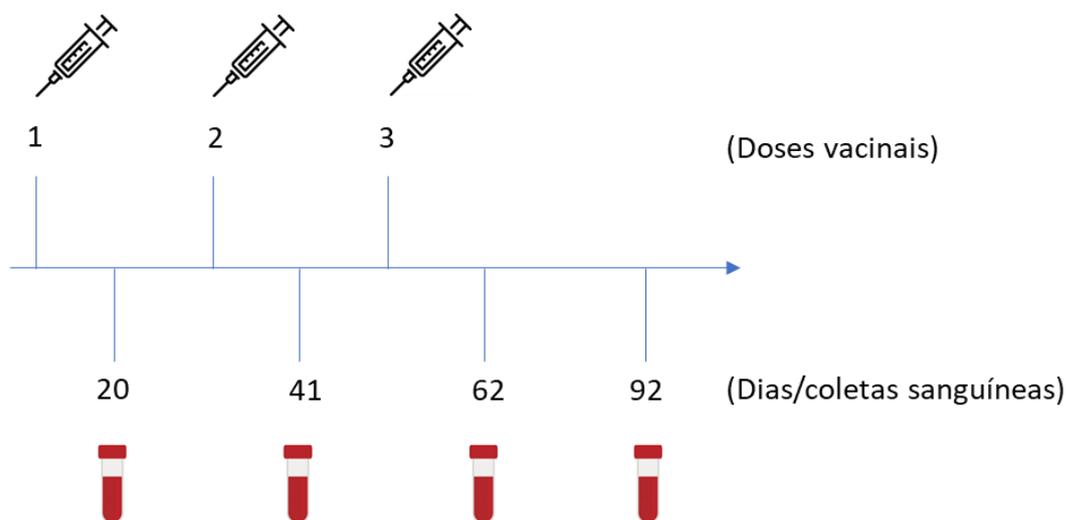
Os ensaios biológicos visando a avaliação da resposta imune em animais foram iniciados após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, que ocorreu em 24 de maio de 2016 (Protocolo CEUA/FCF/520). Os procedimentos com uso de animais foram realizados nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, em ambiente apropriado, com temperatura, luz e umidade controladas. No presente trabalho foram utilizadas fêmeas de camundongos entre 6-8 semanas, isogênicos da linhagem C57BL/6, com peso entre 20-25g, obtidos do biotério de experimentação da FCF/IQ-USP. Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inoxidável, contendo maravalha estéril, a qual foi mantida limpa através de trocas ao longo do tempo de permanência dos animais.

#### **3.7.2 IMUNIZAÇÕES EXPERIMENTAIS**

##### **3.7.2.1 ANÁLISE CURVA DOSE RESPOSTA**

Um ensaio de análise curva dose resposta para a proteína recombinante PvAMA-1-Chesson-I foi realizado anteriormente aos ensaios envolvendo a comparação da imunogenicidade entre as novas proteínas recombinantes. Grupos experimentais compostos por 3 animais receberam 3 doses vacinais contendo 1, 5 ou 10 $\mu$ g da proteína recombinante PvAMA-1-Chesson-I, isolada, na presença de 50 $\mu$ g do adjuvante ácido poli-inosínico-poli-citidílico de elevada massa molecular Poly(I:C) (InvivoGen, USA Inc., San Diego, CA), num volume final de 0,1mL, com intervalo de 21 dias. O grupo controle foi composto por animais imunizados apenas com o adjuvante Poly(I:C) dissolvido em PBS.

As imunizações foram realizadas por via subcutânea (s.c) na base da cauda, as coletas sanguíneas foram realizadas 20 dias após cada uma das doses vacinais, adicionalmente uma coleta ocorreu 50 dias após a 3ª dose vacinal. Ao final deste experimento os animais foram acompanhados por um período de 92 dias, permitindo assim avaliar o título de anticorpos IgG induzidos no período de 1 mês após as 3 doses vacinais (Figura 7). Todas as amostras sanguíneas foram processadas e o soro obtido através de centrifugação foi identificado e estocado à temperatura de -20°C até a sua utilização. Os soros obtidos foram avaliados por ELISA quanto ao reconhecimento das proteínas por anticorpos IgG.

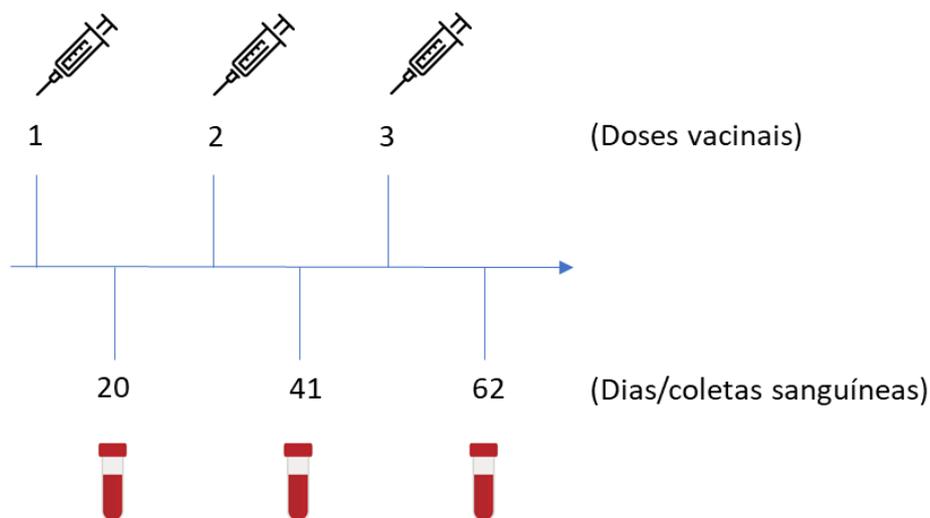


**Figura 8: Representação esquemática das imunizações, coleta sanguínea e análise dos títulos de anticorpos IgG induzidos na análise curva dose resposta.**

### **3.7.2.2 ANÁLISE DA IMUNOGENICIDADE DAS NOVAS PROTEÍNAS PvAMA-1**

Os grupos experimentais, compostos por 6 animais receberam 3 doses de 10µg das proteínas recombinantes PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-PNG\_62\_MU, PvAMA-1-Indonesia\_XIX, PvAMA-1-SK0814-apical, PvAMA-1-Sal-1 e PvAMA-1-Chesson-I, isoladas ou em combinação equimolar (Mix). Adicionalmente a este experimento incluímos a proteína PvAMA-1 previamente obtida pelo grupo em trabalho anterior (VICENTIN et al., 2014), a fim de avaliar o desempenho das novas proteínas PvAMA-1 em comparação com o desempenho da proteína obtida anteriormente na indução de títulos de anticorpos IgG, na presença de 50µg do adjuvante Poly(I:C), num volume final de até 0,130mL, com intervalo de 21 dias. O grupo de controle foi composto por animais imunizados apenas com o adjuvante Poly(I:C) dissolvido em PBS.

As imunizações foram realizadas por via subcutânea (s.c) no dorso (1ª dose vacinal), e laterais direita e esquerda (2ª e 3ª doses vacinais), as coletas sanguíneas foram realizadas 20 dias após cada uma das doses vacinais. Ao término deste experimento os animais foram acompanhados por um período de 62 dias, permitindo assim avaliar os títulos de anticorpos IgG induzidos neste período (Figura 8). Todas as amostras sanguíneas foram processadas e o soro obtido através de centrifugação foi identificado e estocado à temperatura de -20°C até a sua utilização. Os soros obtidos foram avaliados por ELISA quanto ao reconhecimento das proteínas por anticorpos IgG.



**Figura 9: Representação esquemática das imunizações, coleta sanguínea e análise dos títulos de anticorpos IgG induzidos na análise da imunogenicidade das novas proteínas PvAMA-1.**

### 3.7.2.3 DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG INDUZIDOS PELAS IMUNIZAÇÕES EXPERIMENTAIS

Placas de 96 poços modelo high binding costar 3590 (Corning, Sigma-Aldrich USA Co.) foram sensibilizadas com 100ng de cada uma das proteínas homólogas PvAMA-1, PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-Sal-I, PvAMA-1-PNG62\_MU, PvAMA-1-Indonesia-XIX, PvAMA-1-SK0814-apical, e PvAMA-1-Chesson-I em tampão de carbonato-bicarbonato [ $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,01M),  $\text{NaHCO}_3$  (0,03 M), pH=9,6]. As placas foram incubadas durante a noite, à temperatura ambiente. Após esta incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS + 0,05% Tween 20, em seguida foram adicionados 200 $\mu\text{L}$ /poço de solução leite- BSA-PBS [leite desnatado 5% (m/v), BSA 2,5% (m/v), PBS pH 7,4], durante o período de 2 horas à temperatura de 37°C para o bloqueio dos sítios inespecíficos.

O soro obtido dos camundongos, foi testado em diluição seriada, a partir de 1:100, em um volume de 50 $\mu\text{L}$ , seguido de incubação durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esta incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS + 0,05 % Tween 20, a cada poço foram então adicionados 50 $\mu\text{L}$  do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories USA Inc.), foi realizada a diluição 1:3.000 em solução leite-BSA-PBS durante o período de 1 hora à temperatura ambiente, e posteriormente a esta etapa as placas foram lavadas 3 vezes com

solução PBS + 0,05% Tween 20. A reação enzimática ocorreu a partir da adição de 1mg/mL de o-p-fenilenediamina (OPD, Sigma-Aldrich USA Co.) e 0,1% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck KGaA DEU Inc.) diluídos em tampão fosfato-citrato [200mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Synth, LabSynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.), 218mM C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> (Synth, LabSynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.). Tal reação foi interrompida pela adição de 50μL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (Synth, LabSynth Produtos para Laboratórios BRA Ltda.). Os títulos específicos anti-AMA-1 foram determinados pela maior diluição com uma DO<sub>492</sub> superior a 0,1 determinada pelo leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA). Os resultados foram expressos como títulos de anticorpos em log<sub>10</sub> ± erro padrão da média (SEM).

### **3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística foi determinada, a partir da utilização do software GraphPad PRISM® versão 5.0 (GraphPad Software, USA Inc., LA Jolla, CA). As comparações foram realizadas pela Análise de Variância Unidimensional (One-Way ANOVA) seguida do teste de Tukey para múltiplos eventos ou pela Análise de Variância Bidimensional (Two-Way ANOVA) seguida do teste de Bonferroni a fim de comparar as diferenças estatísticas entre as médias dos títulos anticorpos IgG obtidos para os grupos imunizados.

## ***RESULTADOS***

## 4 RESULTADOS

### 4.1 OBTENÇÃO DAS NOVAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES BASEADAS NO ECTODOMÍNIO DE PvAMA-1

Os plasmídeos contendo os novos genes baseados em PvAMA-1 foram obtidos comercialmente, como descrito em Material e Métodos. Após a expansão clonal, os mesmos foram avaliados quanto à integridade de seus sítios enzimáticos, por digestão simples com cada uma das enzimas de restrição SalI, EcoRI ou NotI. Por digestão dupla com as enzimas EcoRI e NotI gera dois fragmentos: um maior de aproximadamente 9.276 bp e um fragmento menor de aproximadamente 1.395 bp correspondente à sequência otimizada dos genes que codificam PvAMA-1.

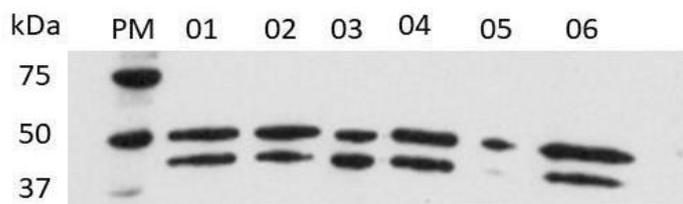
Para obtenção do clone de expressão das novas proteínas, 52 clones de cada levedura transformada foram utilizados para seleção quanto à resistência ao antibiótico Geneticina (G418) em concentrações crescentes a partir de 0,5 até 8,0 mg/mL em meio YPD ágar. Os resultados obtidos para os clones PvAMA-1-Sal-I, PvAMA-1-Belem, e PvAMA-1-Indonesia-XIX permitiram isolar clones resistentes até a concentração final de 2,0 mg/mL do antibiótico. Para o clone PvAMA-1-SK0814-apical foi observada a resistência até a concentração final de 4,0 mg/mL. Por fim, nos clones PvAMA-1-PNG\_62\_MU e PvAMA-1-Chesson-I foi observada a resistência até a concentração final de 8,0 mg/mL.

Um clone de cada levedura transformada resistente à maior concentração de Geneticina foi selecionado para expressão em pequena escala. Alíquotas da cultura foram recolhidas após 48, 72 e 96 horas de indução com metanol, após o estabelecimento das melhores condições de meio de cultivo [comparação entre o volume de cultura do meio indutor (BMMY) com o meio repressor (BMGY)] e tempo de cultura. Para estabelecimento das condições ótimas de indução, os clones foram submetidos a indução com metanol nas concentrações 0,5, 1,0 e 2,0% e a presença das proteínas no sobrenadante foi analisada por SDS-PAGE 12% (material suplementar). As condições que foram estabelecidas para a expressão de cada uma das novas proteínas estão descritas na Tabela 1 e o perfil eletroforético das proteínas expressas nas condições que foram selecionadas pode ser observado no material suplementar Figuras 1 e 2.

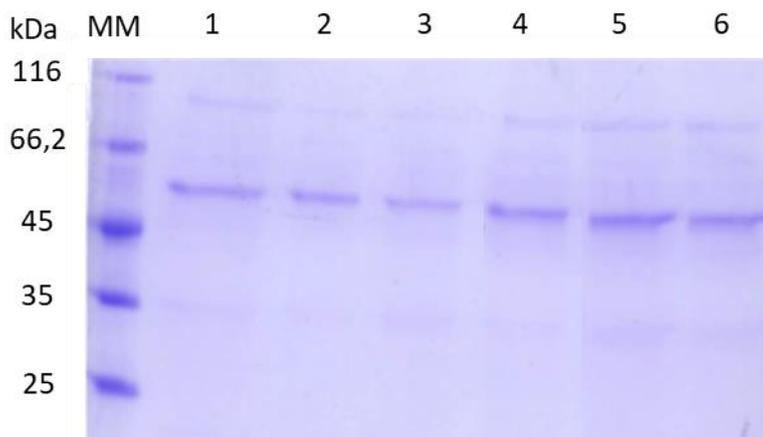
**Tabela 1 – Condições de cultura e indução (metanol) para a expressão das novas proteínas PvAMA-1.**

Proteína	Condição de Meio Indutor	% metanol no meio indutor	Tempo de manutenção da cultura
PvAMA-1-Belem	mantém volume	1,0	96 horas
PvAMA-1-Sal-I	concentra 50%	1,0	96 horas
PvAMA-1-PNG_62_MU	concentra 50%	1,0	96 horas
PvAMA-1-Chesson-I	mantém volume	1,0	96 horas
PvAMA-1-SK0814-apical	concentra 50%	0,5	96 horas
PvAMA-1-Indonesia-XIX	mantém volume	2,0	96 horas

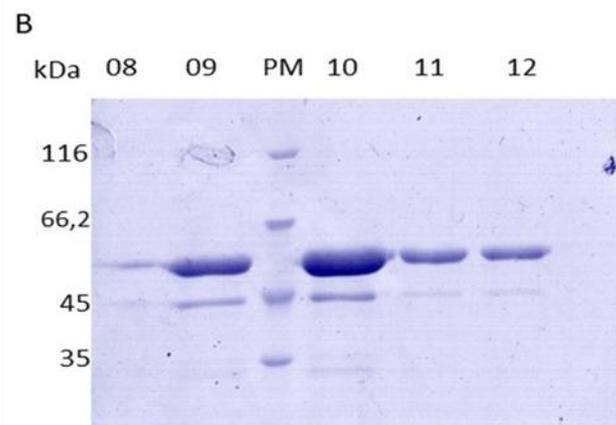
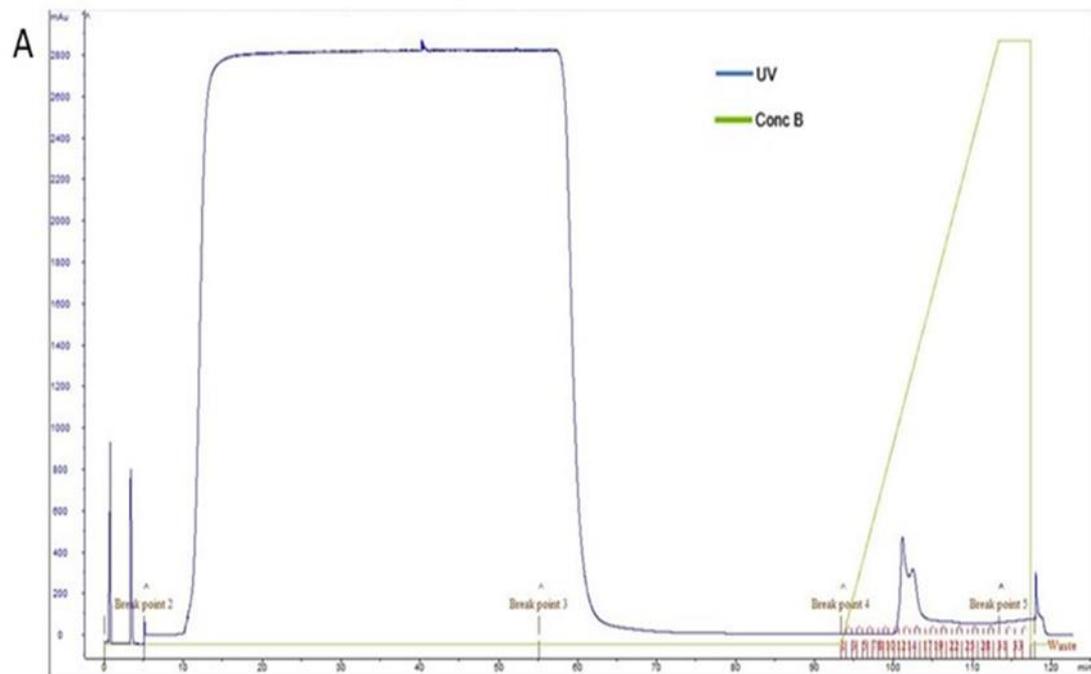
Após o estabelecimento das condições de expressão, as proteínas PvAMA-1 foram submetidas à análise por *immunoblotting* utilizando o anticorpo monoclonal anti-domínio II da proteína AMA-1 (GENTIL et al., 2010) sob condições reduzidas, a fim de saber se os epítomos estavam expostos nas diferentes formas alélicas de PvAMA-1. Foi possível observar que o anticorpo monoclonal reconheceu as diferentes proteínas PvAMA-1, e um novo *immunoblotting* foi realizado após a purificação das novas proteínas PvAMA-1 (Figura 10). Após o estabelecimento das condições de cultura de cada nova proteína em pequena escala, a cultura foi escalonada para 500 mL de BMMY. O material obtido foi submetido a análise a partir do padrão de migração em gel SDS-PAGE 12% (Figura 11), visando atender a expressão em média escala, e obter proteína para os ensaios de caracterização, imunizações experimentais e análise dos títulos de anticorpos obtidos a partir das imunizações. Após a expressão em média escala, as proteínas obtidas foram submetidas ao processo de purificação através de cromatografia por afinidade (Figuras 12 a 17) seguida por cromatografia por troca iônica (Figuras 18 a 23). As proteínas purificadas apresentaram um bom rendimento final (Tabela 2).



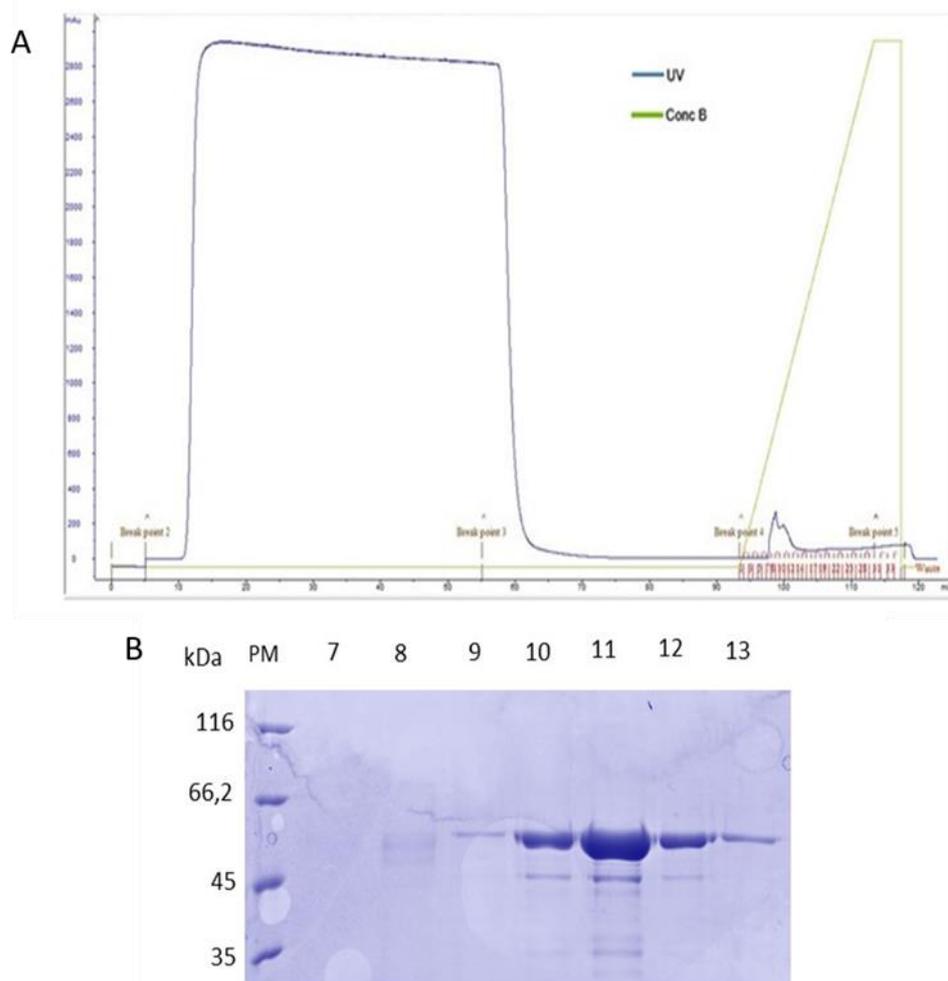
**Figura 10: Detecção por *immunoblotting* das novas proteínas PvAMA-1.** Para a análise foi utilizada a concentração de 1 $\mu$ g de cada proteína purificada, o anticorpo monoclonal específico anti-AMA1-DII-K<sub>243</sub> [1:500, (v/v)], sob condições reduzidas por 2-mercaptoetanol, para a revelação foram utilizados os reagentes Western Blotting detection reagent, Amersham<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup> Prime (GE HealthCare, USA Inco.) em filme fotográfico (GE HealthCare). MM – corresponde ao marcador de massa molecular, 01- PvAMA-1-SK0814-apical, 02 – PvAMA-1-Belem, 03 – PvAMA-1-Chesson-I, 04 – PvAMA-1-Sal-I, 05 – PvAMA-1-Indonesia-XIX, 06 – PvAMA-1-PNG\_62\_MU.



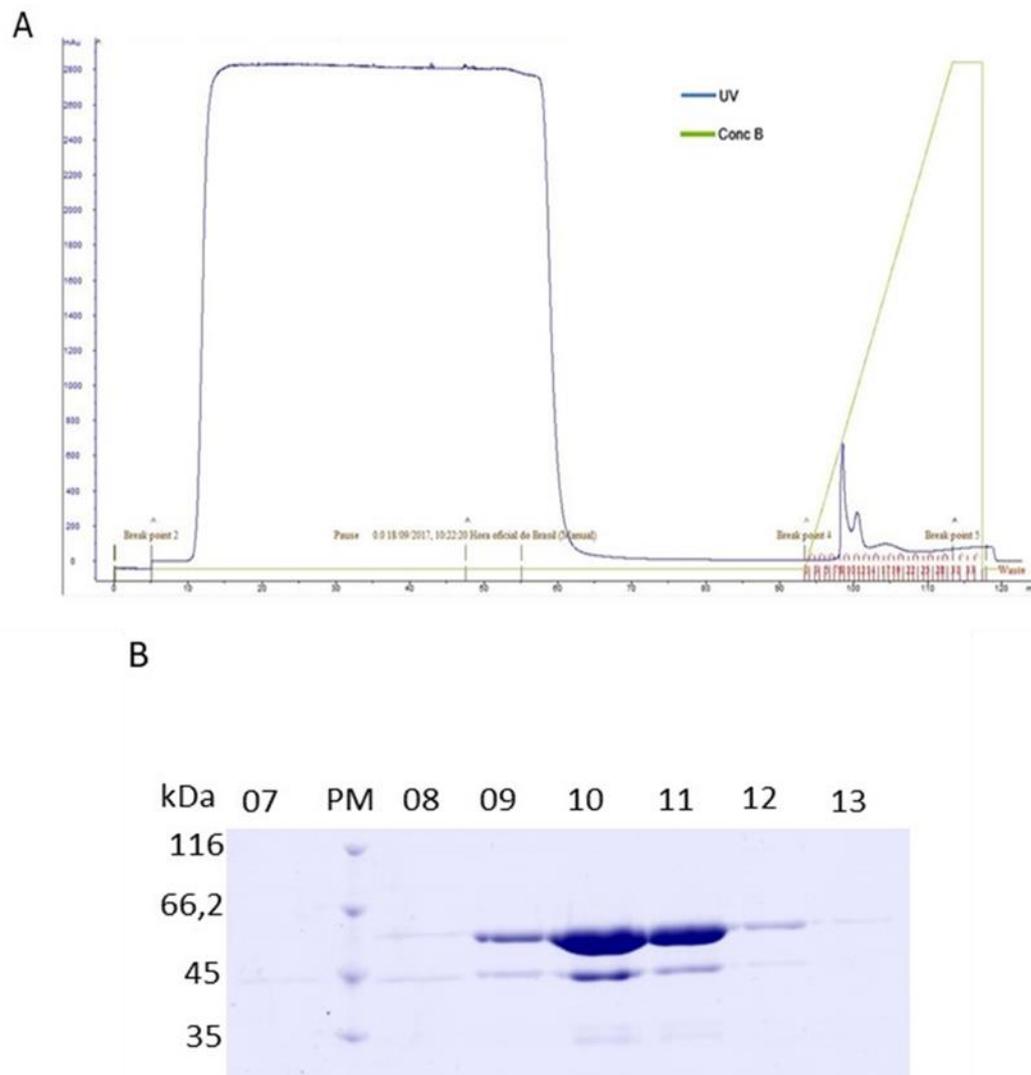
**Figura 11: Padrão de migração das novas proteínas PvAMA-1.** Para a análise foram utilizados 15 $\mu$ L de cada nova proteína obtida após a filtração do sobrenadante de cultura, sob condições reduzidas por 2-mercaptoetanol. As novas PvAMA-1 são solúveis, a partir de 24h de indução e apresentam um padrão de migração em aproximadamente 53kDa. MM – corresponde ao marcador de massa molecular, 1 – PvAMA-1-Sal-I, 2 – PvAMA-1-Belem, 3 – PvAMA-1-SK0814-apical, 4 – PvAMA-1-Chesson-I, 5 – PvAMA-1-PNG\_62\_MU, 6 – PvAMA-1-Indonesia-XIX.



**Figura 12: Purificação por afinidade da proteína PvAMA-1-Belem.** A) Cromatograma obtido para proteína PvAMA-1-Belem, foram coletadas as alíquotas correspondentes aos tubos 08 a 12. B) Gel SDS-PAGE 12% com o padrão de migração das alíquotas coletadas após a purificação.

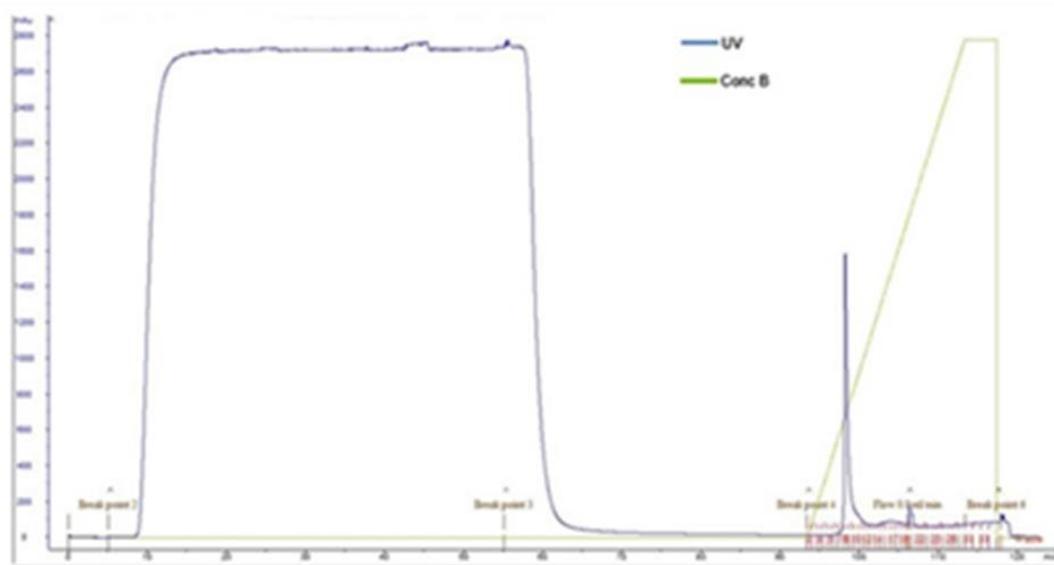


**Figura 13: Purificação por afinidade da proteína PvAMA-1-Chesson-I.** A) Cromatograma obtido para proteína PvAMA-1-Chesson-I, foram coletadas as alíquotas correspondentes aos tubos 07 a 13. B) Gel SDS-PAGE 12% com padrão de migração das alíquotas coletadas após a purificação.

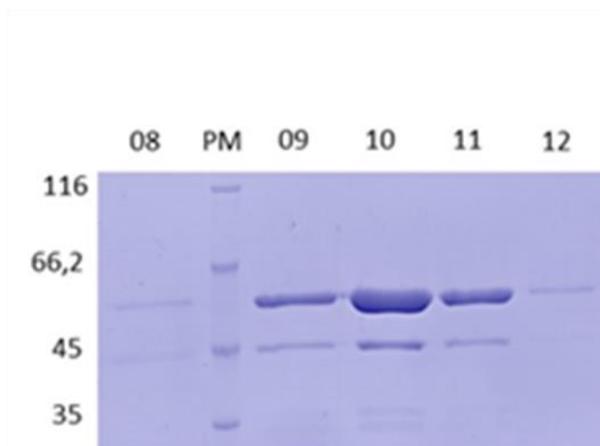


**Figura 14: Purificação por afinidade da proteína PvAMA-1-Indonésia-XIX.** A) Cromatograma obtido para proteína PvAMA-1-Indonésia-XIX, foram coletadas as alíquotas correspondentes aos tubos 07 a 13. B) Gel SDS-PAGE 12% com padrão de migração das alíquotas coletadas após a purificação.

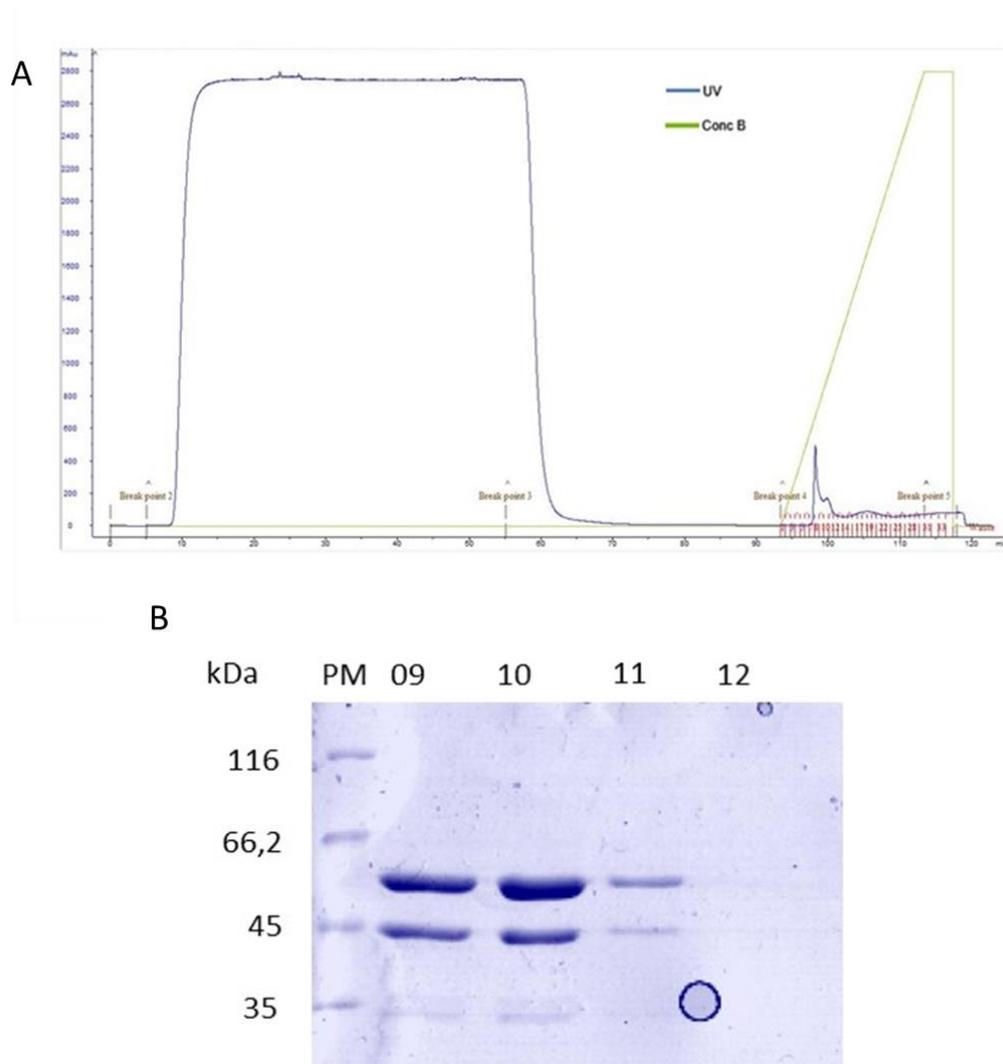
A



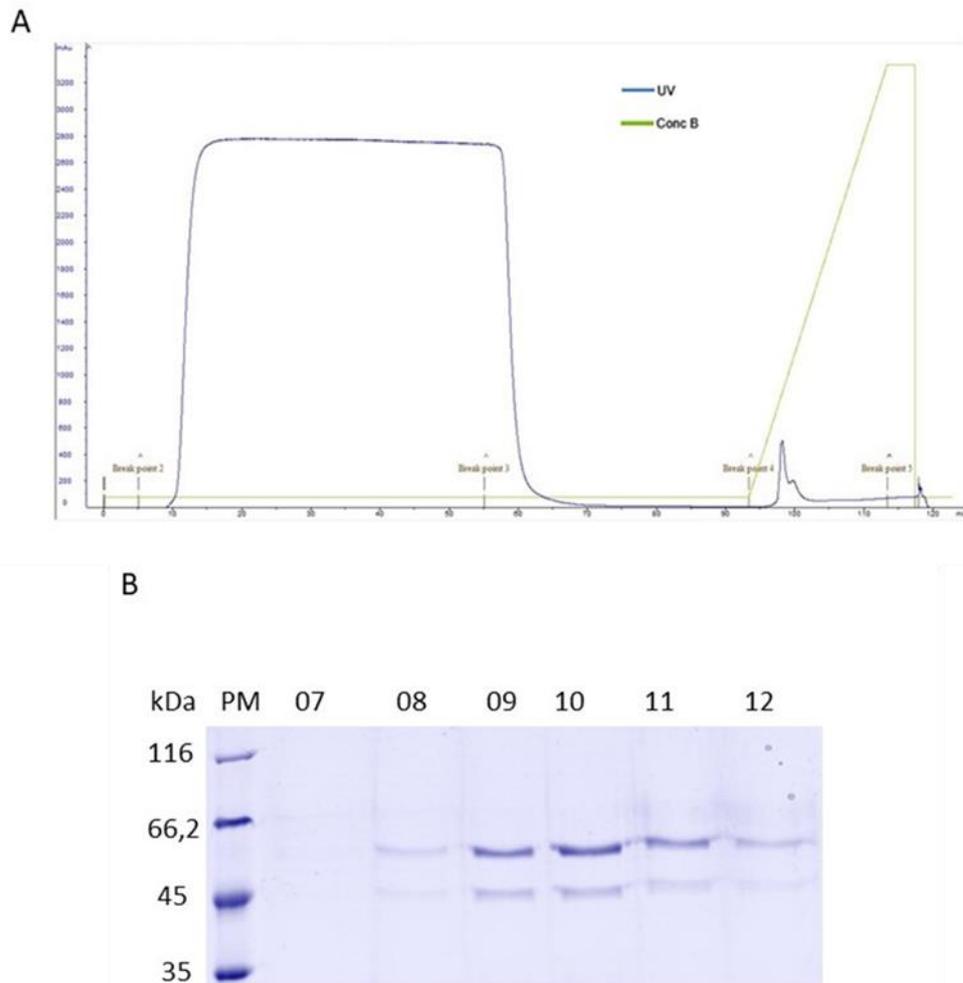
B



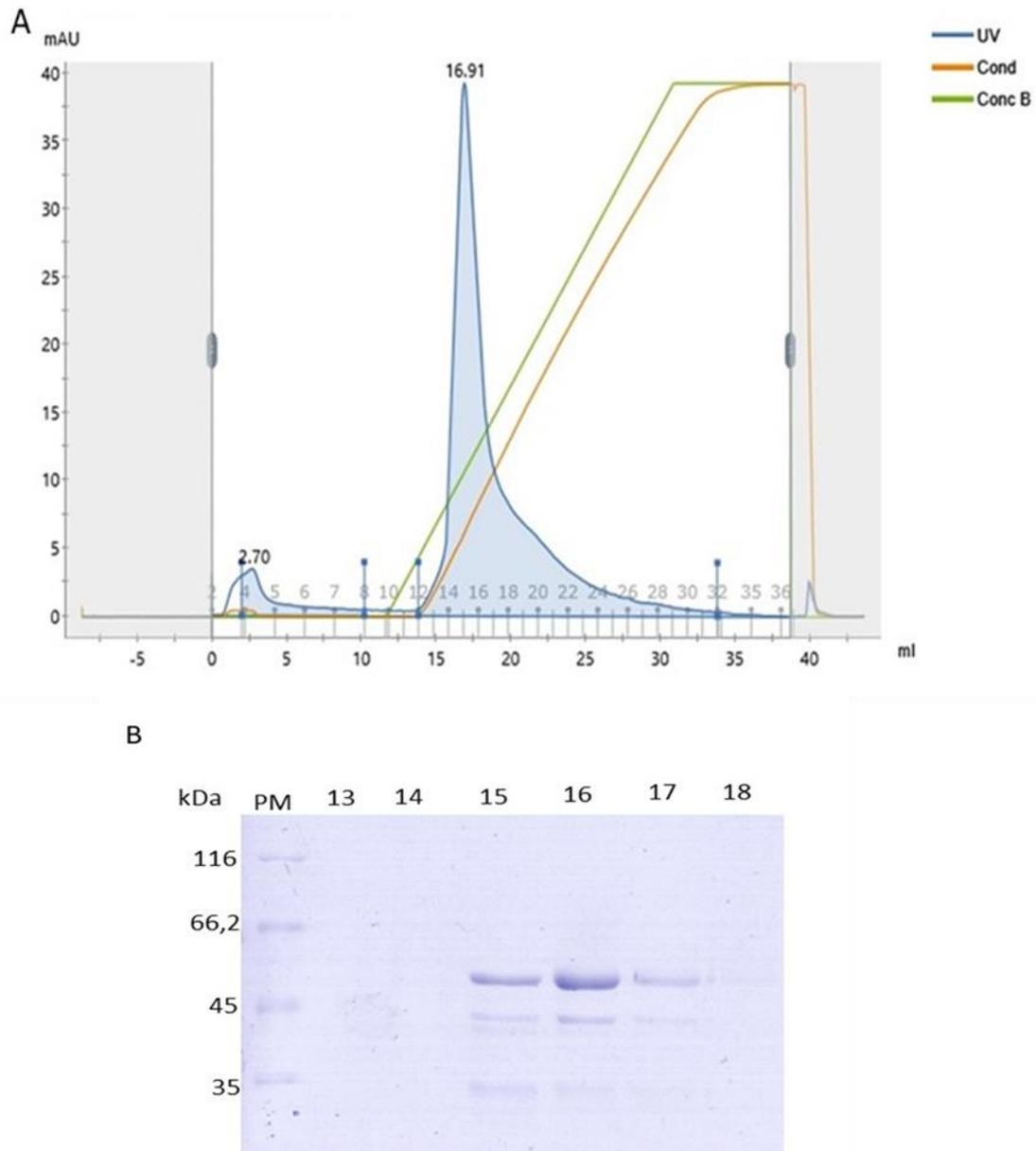
**Figura 15: Purificação por afinidade da proteína PvAMA-1-PNG\_62\_MU.** A) Cromatograma obtido para proteína PvAMA-1-PNG\_62\_MU, foram coletadas as alíquotas correspondentes aos tubos 08 a 12. B) Gel SDS-PAGE 12% com padrão de migração das alíquotas coletadas após a purificação.



**Figura 16: Purificação por afinidade da proteína PvAMA-1-Sal-I.** A) Cromatograma obtido para proteína PvAMA-1-Sal-I, foram coletadas as alíquotas correspondentes aos tubos 09 a 12. B) Gel SDS-PAGE 12% com padrão de migração das alíquotas coletadas após a purificação.

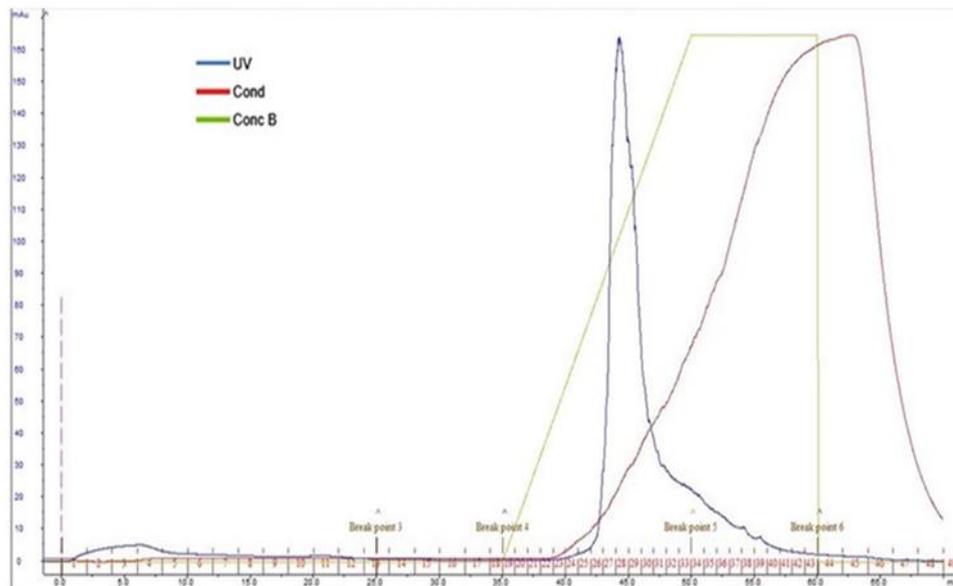


**Figura 17: Purificação por afinidade da proteína PvAMA-1-SK0814-apical.** A) Cromatograma obtido para proteína PvAMA-1-SK0814-apical, foram coletadas as alíquotas correspondentes aos tubos 07 a 12. B) Gel SDS-PAGE 12% com padrão de migração das alíquotas coletadas após a purificação.



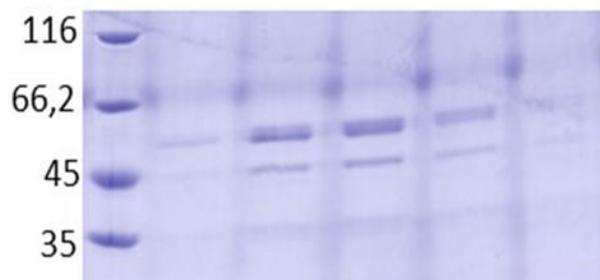
**Figura 18: Purificação por troca iônica da proteína PvAMA-1-Belem.** A) Cromatograma obtido para proteína PvAMA-1-Belem, as alíquotas correspondentes aos tubos 13 a 18, foram coletadas. B) Gel SDS-PAGE 12% com padrão de migração das alíquotas coletadas após a purificação.

A

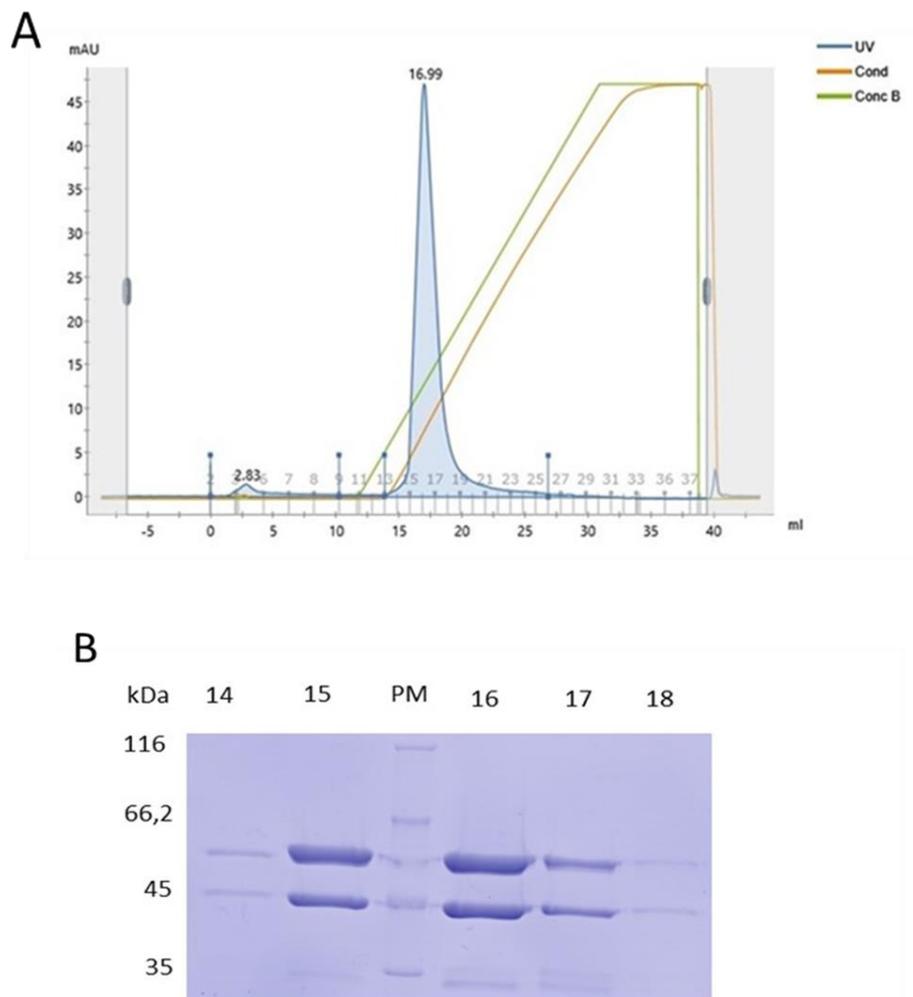


B

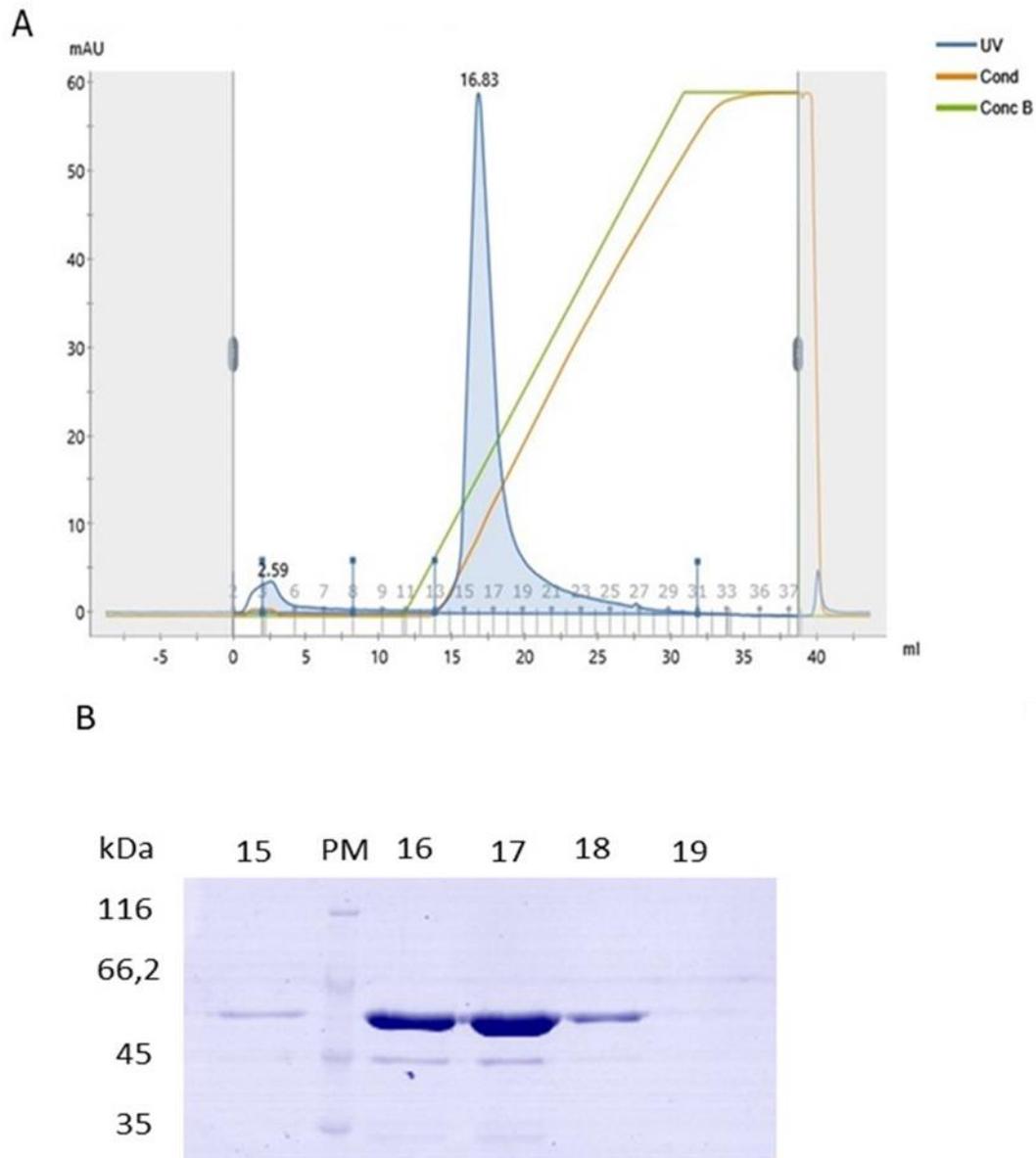
kDa PM 24 25 26 27 28



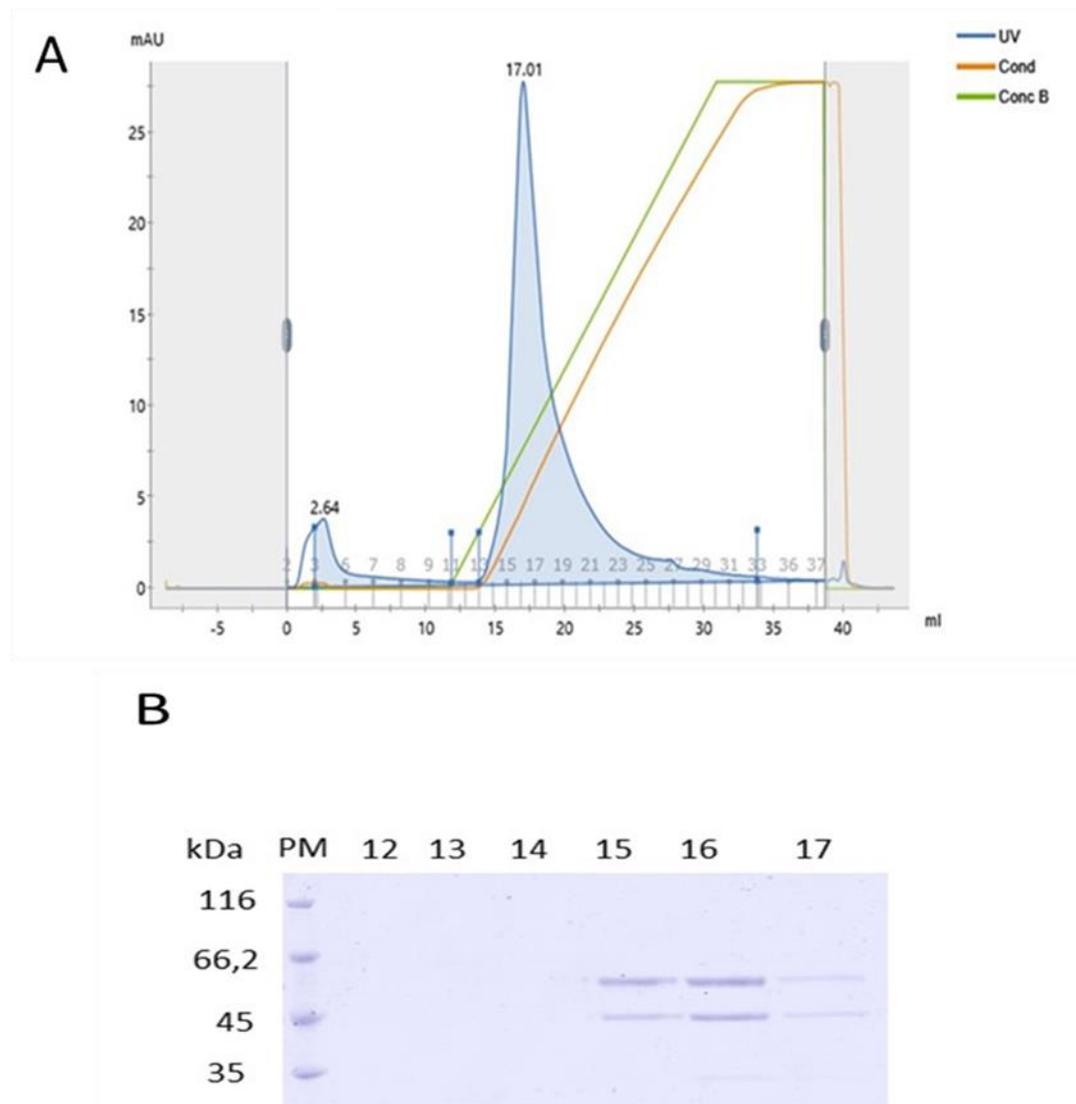
**Figura 19: Purificação por troca iônica da proteína PvAMA-1-Chesson-I.** A) Cromatograma obtido para proteína PvAMA-1-Chesson-I, as alíquotas correspondentes aos tubos 24 a 28, foram coletadas. B) Gel SDS-PAGE 12% com padrão de migração das alíquotas coletadas após a purificação.



**Figura 20: Purificação por troca iônica da proteína PvAMA-1-Indonésia-XIX.** A) Cromatograma obtido para proteína PvAMA-1-Indonésia-XIX, as alíquotas correspondentes aos tubos 14 a 18, foram coletadas. B) Gel SDS-PAGE 12% com padrão de migração das alíquotas coletadas após a purificação.

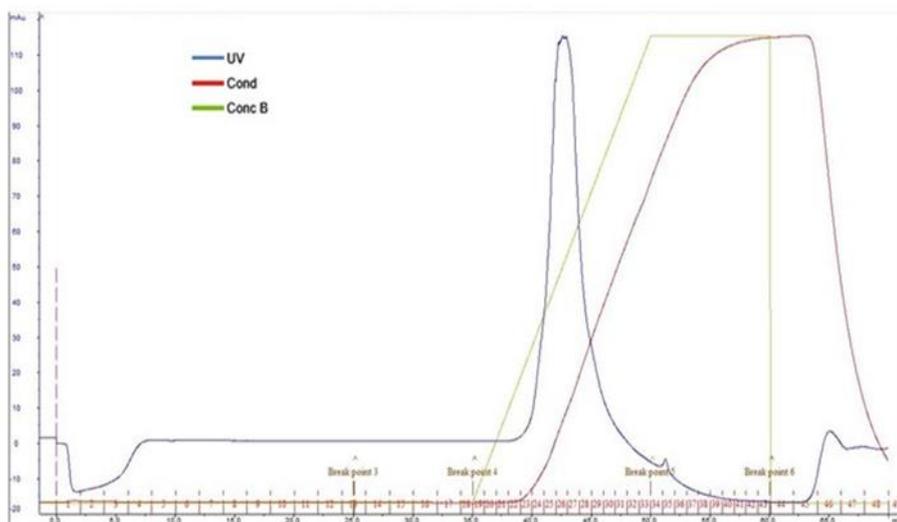


**Figura 21: Purificação por troca iônica da proteína PvAMA-1-PNG\_62\_MU.** A) Cromatograma obtido para proteína PvAMA-1-PNG\_62\_MU, as alíquotas correspondentes aos tubos 15 a 19, foram coletadas. B) Gel SDS-PAGE 12% com padrão de migração das alíquotas coletadas após a purificação.

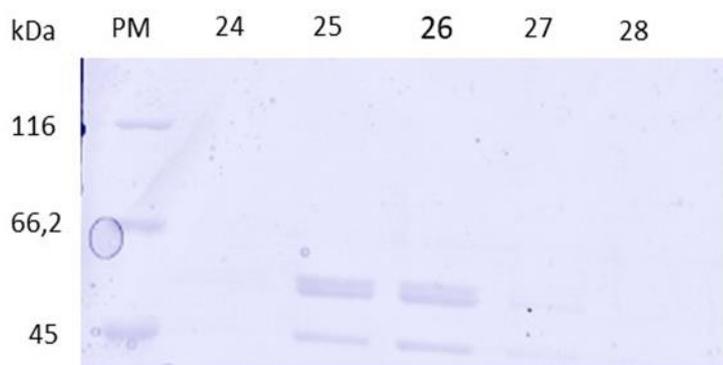


**Figura 22: Purificação por troca iônica para proteína PvAMA-1-Sal-I.** A) Cromatograma obtido para proteína PvAMA-1-Sal-I, as alíquotas correspondentes aos tubos 12 a 17, foram coletadas. B) Gel SDS-PAGE 12% com padrão de migração das alíquotas coletadas após a purificação.

A



B



**Figura 23: Purificação por troca iônica para proteína PvAMA-1-SK0814-apical.** A) Cromatograma obtido para proteína PvAMA-1-SK0814-apical, as alíquotas correspondentes aos tubos 24 a 28, foram coletadas. B) Gel SDS-PAGE 12% com padrão de migração das alíquotas coletadas após a purificação.

**Tabela 2 – Rendimento obtido para as novas proteínas PvAMA-1**

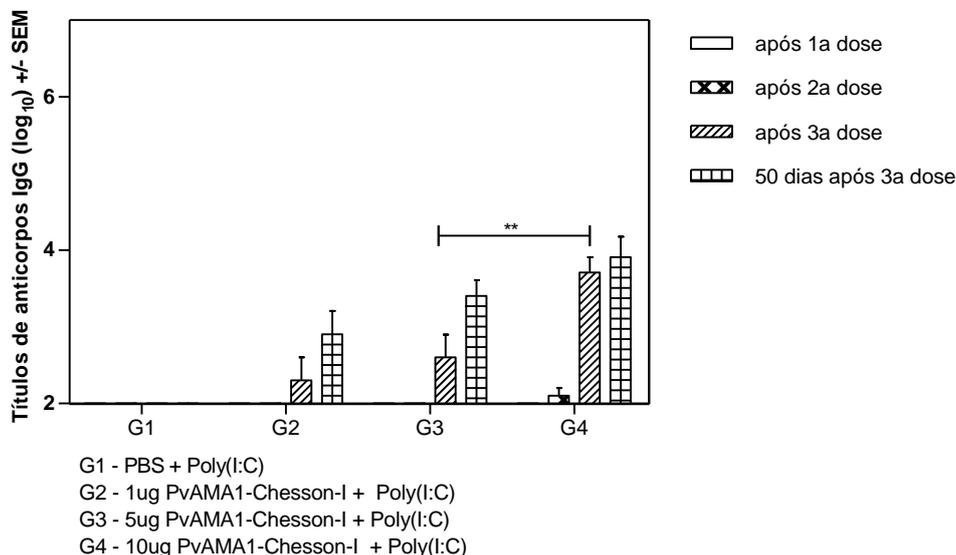
Proteína	Rendimento (mg/L)
PvAMA-1-Belem	2,510
PvAMA-1-Sal-I	3,262
PvAMA-1-Chesson-I	9,785
PvAMA-1-SK0814-apical	2,114
PvAMA-1-Indonesia-XIX	4,745
PvAMA-1-PNG_62_MU	2,200

## **4.2 DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA DE ANTICORPOS INDUZIDA EM CAMUNDONGOS A PARTIR DA VACINAÇÃO COM AS NOVAS PROTEÍNAS PvAMA-1**

### **4.2.1 DETERMINAÇÃO DA MAGNITUDE DA RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG CONTRA A PROTEÍNA PvAMA-1-CHESSON-I EM DIFERENTES CONDIÇÕES**

No primeiro experimento de imunização, testamos 3 diferentes doses (1, 5 e 10 $\mu$ g da proteína recombinante PvAMA-1-CHESSON-I, emulsificada em 50 $\mu$ g do adjuvante Poly(I:C), com intervalo de 21 dias entre as doses. Camundongos C57BL/6 foram imunizados pela via s.c., e os soros foram coletados 3 semanas após cada dose para análise dos títulos de anticorpos por ELISA. A Figura 24 mostra que os camundongos imunizados desenvolveram títulos de anticorpos IgG crescentes após cada dose e estes títulos se mantiveram altos até a última medição feita 50 dias após a terceira dose. Portanto, estes títulos alcançaram seu valor máximo. Podemos afirmar que os anticorpos detectados foram específicos para a proteína PvAMA-1, já que os animais que receberam somente

adjuvante (G1) não apresentaram anticorpos detectáveis. Com base nos dados obtidos, selecionamos a dose de 10 $\mu$ g da proteína PvAMA-1 para os estudos subsequentes.

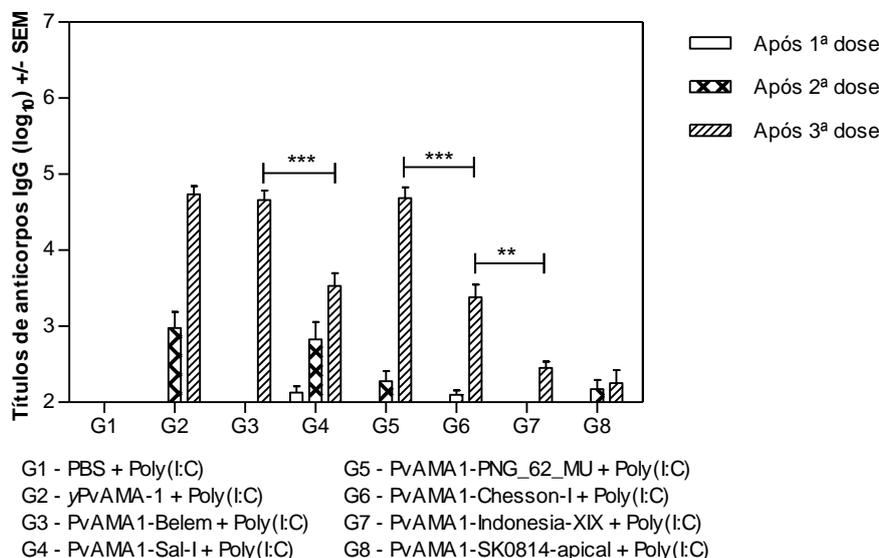


**Figura 24: Análise da resposta de anticorpos IgG após a imunização de camundongos com a proteína recombinante PvAMA-1-Chesson-I.** Camundongos C57BL/6 foram imunizados três vezes com 1, 5 ou 10 $\mu$ g da proteína recombinante emulsificada em 50 $\mu$ g do adjuvante Poly(I:C) com intervalo de 21 dias. Os animais do grupo controle receberam apenas o adjuvante dissolvido em PBS. Os resultados estão expressos como média aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo  $\log_{10} \pm \text{SEM}$ , e foram comparados estatisticamente utilizando One-Way ANOVA, seguido por Tukey test para múltiplos eventos. Foi observada a diferença estatística significativa  $** (p < 0,01)$  entre as terceiras doses do grupo G4 quando comparada aos títulos de anticorpos obtidos para o grupo G3. Porém quando observados os títulos de anticorpos 50 dias após a terceira dose dos grupos 3 e 4 não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Entre os grupos G2 e G3 não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) após a análise estatística.

#### 4.2.2 DETERMINAÇÃO DA MAGNITUDE DA RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG CONTRA AS NOVAS PROTEÍNAS PvAMA-1

Os títulos de anticorpos contra as diferentes formas alélicas de PvAMA-1 apresentaram magnitudes distintas (Figura 25). Após 3 doses, as proteínas yPvAMA-1, PvAMA-1-Belem e PvAMA-1-PNG\_62\_MU induziram os mais altos títulos de anticorpos quando comparadas aos grupos PvAMA-1-Sal-I e PvAMA-1-Chesson-I

( $p < 0,001$ ). Por outro lado, as proteínas PvAMA-1-Indonesia-XIX e PvAMA-1-SK0814-apical induziram os mais baixos títulos de anticorpos.



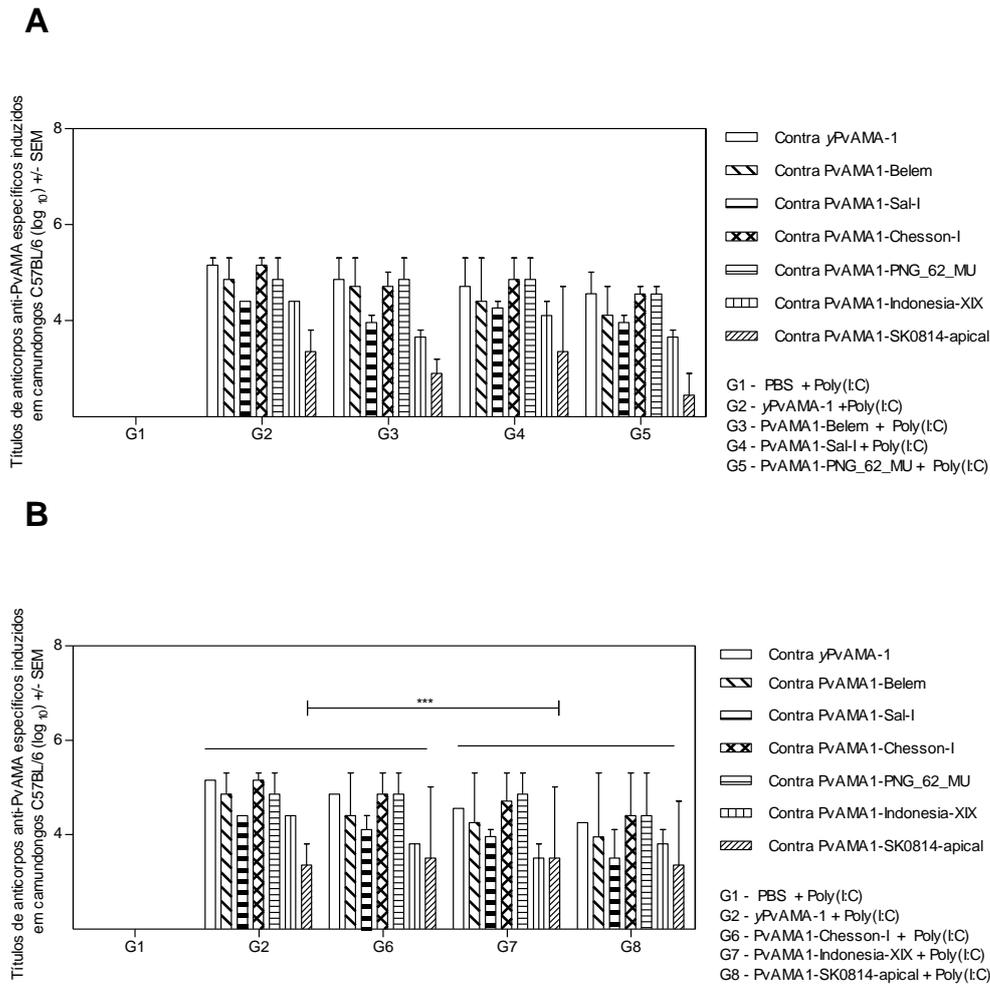
**Figura 25: Análise da resposta de anticorpos IgG após a imunização de camundongos com as novas proteínas PvAMA-1.** Camundongos C57BL/6 foram imunizados três vezes com 10 $\mu$ g de cada proteína recombinante emulsificada em 50 $\mu$ g do adjuvante Poly(I:C) com intervalo de 21 dias. Animais do grupo controle receberam apenas o adjuvante dissolvido em PBS. Este resultado é demonstrativo de dois experimentos. A análise foi realizada pela comparação dos títulos de anticorpos obtidos após a terceira dose vacinal. Os resultados estão expressos como média aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo  $\log_{10} \pm \text{SEM}$ , e foram comparados estatisticamente utilizando Two-Way ANOVA, seguido por Bonferroni test para análise de múltiplos eventos. A diferença estatisticamente significativa está destacada: \*\*\* ( $p < 0,001$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ). Entre os grupos G7 e G8 não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) após a análise estatística.

#### 4.2.3 DETERMINAÇÃO DA MAGNITUDE DA RESPOSTA DE ANTICORPOS IgG OBTIDA CONTRA O MIX DAS NOVAS PROTEÍNAS PvAMA-1

Os títulos de anticorpos induzidos a partir da imunização com as novas proteínas PvAMA-1 em combinação equimolar são apresentados na Figura 26. Os títulos de anticorpos induzidos a partir da imunização com a combinação equimolar das novas proteínas PvAMA-1 foram significativamente maiores contra as proteínas PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-PNG\_62\_MU e PvAMA-1-Chesson-I ( $p < 0,001$ ) quando comparados aos títulos de anticorpos obtidos contra as proteínas PvAMA-1-Sal-I e PvAMA-1-



PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-Sal-I, PvAMA-1-PNG\_62\_MU, PvAMA-1-Chesson-I, PvAMA-1-Indonesia-XIX e PvAMA-1-SK0814-apical (Figura 27). Em A, ao avaliarmos os títulos de anticorpos induzidos contra as proteínas  $\gamma$ PvAMA-1, PvAMA1-Belem, PvAMA-1-Sal-I e PvAMA-1-PNG\_62\_MU, não observamos diferenças estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ). Em B, quando ao compararmos os títulos anticorpos induzidos pelas proteínas  $\gamma$ PvAMA-1 e PvAMA-1-Chesson-I entre si, assim como pelas proteínas PvAMA-1-Indonesia-XIX e PvAMA-1-SK0814-apical entre si, não foram encontradas diferenças significativas ( $p>0,05$ ). No entanto, quando comparamos os títulos de anticorpos induzidos pelas proteínas  $\gamma$ PvAMA-1, PvAMA-1-Chesson-I, PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-Sal-I, PvAMA-1-PNG\_62\_MU, observamos diferenças significativas ( $p<0,001$ ), em comparação aos títulos de anticorpos obtidos contra as proteínas PvAMA-1-Indonesia-XIX e PvAMA-1-SK0814-apical.



**Figura 27: Os anticorpos anti-PvAMA-1 reconhecem as variantes alélicas de PvAMA-1.** Os anticorpos anti-PvAMA-1 induzidos em camundongos C57BL/6 foram testados contra as novas proteínas recombinantes PvAMA-1. O resultado obtido a partir da análise do pool da terceira sangria dos animais representa dois experimentos e um total de 24 animais por grupo. Os resultados estão expressos como média aritmética dos títulos de anticorpos de cada grupo em  $\log_{10} \pm$  SEM, foram estatisticamente comparados usando Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni para análise de múltiplos eventos. A diferença estatística está destacada: \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Os grupos G2, G3, G4, G5 e G6 não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) após análise estatística.

***DISCUSSÃO***

## 5 DISCUSSÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem se empenhado na eliminação e controle dos casos de Malária nos países os quais a doença se encontra, obtivemos avanço, mas muito há muito a ser feito.

No campo do desenvolvimento de vacinas, a vacina RTS,s, registrada como Mosquirix™ da fabricante GSK, voltada para proteção na infecção por *P. falciparum*, estágio pré-eritrocítico, chegou ao topo das pesquisas e hoje está cotada no programa piloto da OMS para implementação da vacina, previsto para começar neste ano de 2018 (CLEMENS; MOORTHY, 2016; WHO, 2017b).

Quanto as vacinas de estágio eritrocítico, em testes clínicos encontram-se as vacinas, PfAMA1-DiCo, DiCo trata-se de uma formulação equimolar que utiliza proteínas recombinantes que compreendem três formas variantes de PfAMA-1, em combinação com o adjuvante Alhydrogel® ou GLA-SE [NCT02014727] em fase 1a/1b, a última atualização deste estudo demonstrou que a vacinação demonstrou-se segura e imunogênica (SIRIMA et al., 2017). As vacinas PAMVAC [NCT02647489] e PRIMVAC [NCT02658253] em fase 1a/1b, são formulações que utilizam proteínas recombinantes baseadas em antígenos encontrados em malária placentária na infecção por *P. falciparum* (CHÊNE et al., 2016; NIELSEN et al., 2015). *Plasmodium vivax* aparece no ensaio clínico utilizando as vacinas ChAd63 ou MVA PvDBP [NCT01816113] em fase 1a, baseada no antígeno PvDBP (região II), as duas formulações vacinais demonstraram ser seguras, imunogênicas e capazes de induzir células B de memória em voluntários adultos saudáveis do Reino Unido (PAYNE et al., 2017; THAM; BEESON; RAYNER, 2017).

Para *vivax* a pesquisa de vacinas direcionadas a antígenos de estágio eritrocítico destaca-se a proteína AMA-1, expressa nas formas merozoíta e esporozoíta, a proteína AMA-1 de *Plasmodium vivax*, estudos anteriores utilizando proteínas recombinantes baseadas em PvAMA-1 mostraram-se bastante imunogênicas nas infecções naturais (BARBEDO et al., 2007; CASALE, 2013; GENTIL et al., 2010; MORAIS et al., 2006; MÚFALO et al., 2008; PEREIRA, 2012; ROCHA et al., 2017; RODRIGUES et al., 2005; VICENTIN et al., 2014). Além disso a proteína PvAMA-1 já mostrou ser imunogênica em modelo animal, utilizando camundongos da linhagem BALB/c (LIMA, 2014;

PEREIRA, 2012; ROCHA et al., 2017; VICENTIN et al., 2014) e C57BL/6 (CASALE, 2013; LIMA, 2014; PEREIRA, 2012; ROCHA et al., 2017) entre as formulações analisadas nestes estudos, anticorpos obtidos a partir da vacinação utilizando a proteína PvAMA-1 em formulação contendo MPLA e Quil A e Poly (I:C) reconheceram a proteína nativa em ensaios de imunofluorescência com lâminas de merozoítos e esquizontes jovens de *Plasmodium vivax*, obtidos de amostras sanguíneas de indivíduos infectados residentes da Tailândia (ROCHA et al., 2017; VICENTIN et al., 2014) PvAMA-1 ainda que forte candidata a vacina contra Malária *vivax*, apresenta um intenso polimorfismo, comum as proteínas AMA-1 (ARNOTT et al., 2013, 2014; CHENET et al., 2012; GONC et al., 2017). O polimorfismo de AMA-1 é associado a estratégias de escape imune, diz respeito a evolução do parasita, e isto representa entraves para as formulações vacinais baseadas neste antígeno (REMARQUE et al., 2008). Estudos utilizando a proteína PfAMA-1 demonstram que algumas variantes estudadas apresentam-se como cepa específica, ou apenas conferem proteção a variantes similares (GRAVES et al., 2016; THERA et al., 2011). Porém, muitos outros estudos reforçam a idéia de que uma abordagem multi alélica na formulação vacinal, deverá ser uma boa estratégia para cobrir o polimorfismo desta proteína, estudos com formulações multi alélicas de PfAMA-1 nos últimos anos fortaleceram a ideia de que a abordagem multi alélica seria promissora para uma formulação vacinal eficaz contra PfAMA-1, chegando a formulação que atualmente encontra-se em teste clínico [NCT02014727] PfAMA-1 DiCo (DUTTA et al., 2014; KASTILAN et al., 2017; KUSI et al., 2009, 2010, 2011a; SIRIMA et al., 2017).

Os resultados prévios do reconhecimento da proteína nativa da Tailândia por anticorpos obtidos com a vacinação por uma cepa PvAMA-1 do Brasil (ROCHA et al., 2017; VICENTIN et al., 2014), somados aos resultados obtidos pela vacinação multi alélica atualmente já em testes clínicos (SIRIMA et al., 2017). Sabendo do intenso polimorfismo que ocorre em AMA-1, no presente trabalho, geramos, caracterizamos e avaliamos a imunogenicidade de novas variantes alélicas PvAMA-1, com base no estudo global de populações da proteína PvAMA-1 (ARNOTT et al., 2013).

No presente trabalho, geramos, caracterizamos e avaliamos a imunogenicidade de seis novas variantes alélicas baseadas na PvAMA-1, com base no estudo global de populações da proteína PvAMA-1 (ARNOTT et al., 2013). Foi possível gerar as novas proteínas recombinantes PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-Sal-I, PvAMA-1-Indonesia-XIX, PvAMA-1-SK0814-apical, PvAMA-1-PNG\_62\_MU e PvAMA-1-Chesson-I com

sucesso. O resultado obtido para o ensaio de *immunoblotting* confirma a expressão das proteínas PvAMA-1. Porém foi observada que a partir da purificação da proteína a mesma apresenta degradações, para estudos futuros a utilizações de ferramentas que inibam a degradação do material obtido são essenciais para a melhor análise destas proteínas.

Uma análise inicial da imunogenicidade da nova proteína PvAMA-1-Chesson-I sob diferentes concentrações foi realizada a fim de avaliar a resposta para doses vacinais contendo 1, 5 ou 10 $\mu$ g da proteína recombinante por dose. Os títulos de anticorpos IgG induzidos a partir do regime de imunização com três doses vacinais no intervalo de 21 dias, em modelo animal utilizando camundongos da linhagem C57BL/6 apresentou uma significativa diferença estatística ( $p < 0,01$ ) entre o grupo que recebeu a dose contendo 10 $\mu$ g de proteína recombinante para com os grupos que receberam 1 e 5  $\mu$ g de proteína respectivamente. A dose final de 10 $\mu$ g de proteína isolada foi então estabelecida para o presente estudo com base neste ensaio, assim como também nos experimentos conduzidos em trabalhos anteriores do grupo utilizando o adjuvante Poly(I:C) (CASALE, 2013; LIMA, 2014; PEREIRA, 2012; ROCHA et al., 2017).

Para a avaliação da imunogenicidade das novas proteínas PvAMA-1, PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-Sal-I, PvAMA-1-Chesson-I, PvAMA-1-PNG\_62\_MU, PvAMA-1-SK0814-apical e PvAMA-1-Indonesia-XIX, a concentração final de 10 $\mu$ g de proteína recombinante por dose, na formulação individual e 2 $\mu$ g de cada uma das proteínas na combinação equimolar, foi adotada seguindo o observado no ensaio curva dose resposta assim como nos estudos que utilizam a abordagem multi alélica para PfAMA-1 (KUSI et al., 2009). A análise do desempenho individual para cada nova proteína recombinante, mostrou que os resultados obtidos a partir da indução de títulos de anticorpos IgG para as novas proteínas PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-PNG\_62\_MU não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre si após análise estatística e também em comparação com os títulos de anticorpos obtidos para a proteína  $\gamma$ PvAMA-1, a qual foi expressa e avaliada anteriormente pelo grupo (VICENTIN et al., 2014), e utilizada como controle para análise da resposta das novas proteínas PvAMA-1.

O número de variantes requeridos para uma formulação multi alélica que venha a cobrir o polimorfismo de AMA-1 é um assunto em discussão, visto o número de variantes disponíveis, o estudo entre as similaridades e o potencial antigênico das proteínas recombinantes baseadas nos antígenos AMA-1 é necessário para uma melhor abordagem utilizando a combinação equimolar de variantes alélicas baseadas no antígeno AMA-1,

no presente estudamos uma formulação multi alélica contendo 6 variantes alélicas de PvAMA-1. Baseado no estudo do fenômeno de diluição do epítipo, EDiP, e sua aplicabilidade para antígenos polimórficos, e tendo como base em estudos publicados para AMA-1, uma vacina eficaz contra este antígeno requer no mínimo três variantes alélicas em sua formulação, indo de encontro aos recentes resultados positivos para formulação vacinal PfAMA-1 DiCo (KUSI et al., 2017; SIRIMA et al., 2017).

***CONCLUSÃO***

## 6. CONCLUSÃO

- I. As novas proteínas recombinantes PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-Sal-I, PvAMA-1-Chesson-I, PvAMA-1-PNG\_62\_MU, PvAMA-1-SK0814-apical e PvAMA-1-Indonesia-XIX foram expressas com sucesso utilizando leveduras *P. pastoris*, na forma de proteínas solúveis, puras e com bom rendimento.
- II. As novas proteínas recombinantes baseadas em PvAMA-1 demonstraram-se imunogênicas na presença do adjuvante Poly(I:C). Os títulos de anticorpos induzidos a partir da imunização com a combinação equimolar das novas proteínas PvAMA-1 foram significativamente maiores contra as proteínas PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-PNG\_62\_MU e PvAMA-1-Chesson-I ( $p < 0,001$ ) quando comparados aos títulos de anticorpos obtidos contra as proteínas PvAMA-1-Sal-I e PvAMA-1-Indonesia. Por outro lado, os títulos de anticorpos contra PvAMA-1-Indonesia-XIX foram significativamente maiores quando comparados aos títulos de anticorpos obtidos contra a proteína PvAMA-1-SK0814-apical ( $p < 0,001$ ).
- III. A partir da análise de especificidade dos anticorpos induzidos a partir da imunização com as novas proteínas PvAMA-1. Os títulos de anticorpos induzidos pelas proteínas  $\gamma$ PvAMA-1, PvAMA-1-Chesson-I, PvAMA-1-Belem, PvAMA-1-Sal-I, PvAMA-1-PNG\_62\_MU, observamos diferenças significativas ( $p < 0,001$ ), em comparação aos títulos de anticorpos obtidos contra as proteínas PvAMA-1-Indonesia-XIX e PvAMA-1-SK0814-apical.
- IV. Em conjunto, os dados obtidos a partir do presente estudo demonstram que a utilização de múltiplas variantes alélicas representa uma estratégia vacinal em potencial, porém a análise e interpretação da resposta imune induzida pela vacinação é dificultada pela complexidade individual das moléculas utilizadas no estudo. Mais estudos são necessários para a predição correta de uma combinação equimolar eficaz universal contra PvAMA-1.

## ***REFERÊNCIAS***

## REFERÊNCIAS

- ACQUAH, F. K. et al. Antibody responses to two new *Lactococcus lactis*-produced recombinant Pfs48/45 and Pfs230 proteins increase with age in malaria patients living in the Central Region of Ghana. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 306, 1 dez. 2017.
- AGNANDJI, S. T. et al. First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 20, p. 1863–75, 17 nov. 2011.
- AGNANDJI, S. T. et al. A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants. **The New England journal of medicine**, v. 367, n. 24, p. 2284–95, 13 dez. 2012.
- ALEXOPOULOU, L. et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. **Nature**, v. 413, n. 6857, p. 732–738, 18 out. 2001.
- ARNOTT, A. et al. Global Population Structure of the Genes Encoding the Malaria Vaccine Candidate, *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 (PvAMA1). **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 10, p. e2506, jan. 2013.
- ARNOTT, A. et al. Distinct patterns of diversity, population structure and evolution in the AMA1 genes of sympatric *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* populations of Papua New Guinea from an area of similarly high transmission. **Malaria journal**, v. 13, p. 233, 2014.
- ASHLEY, E. A.; PYAE PHYO, A.; WOODROW, C. J. Malaria. **The Lancet**, v. 391, n. 10130, p. 1608–1621, 21 abr. 2018.
- BABON, J. J. et al. Structural studies on *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 153, n. 1, p. 31–40, maio 2007.
- BAI, T. et al. Structure of AMA1 from *Plasmodium falciparum* reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 36, p. 12736–41, 6 set. 2005.
- BAKER, D. A. Malaria gametocytogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 172, n. 2, p. 57–65, 1 ago. 2010.
- BARBEDO, M. B. et al. Comparative recognition by human IgG antibodies of recombinant proteins representing three asexual erythrocytic stage vaccine candidates of *Plasmodium vivax*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 335–340, 10 maio 2007.
- BARGIERI, D. Y. et al. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella Typhimurium* FliC flagellin. **Vaccine**, v. 26, n. 48, p. 6132–6142, 2008.
- BHARDWAJ, R. et al. Production of recombinant PvDBPII, receptor binding domain of *Plasmodium vivax* Duffy binding protein, and evaluation of immunogenicity to identify an adjuvant formulation for

- vaccine development. **Protein Expression and Purification**, 2015.
- BITENCOURT, A. R. et al. Antigenicity and immunogenicity of Plasmodium vivax merozoite surface protein-3. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56061, 2013.
- BLAGBOROUGH, A. M. et al. Transmission blocking potency and immunogenicity of a plant-produced Pvs25-based subunit vaccine against Plasmodium vivax. **Vaccine**, v. 34, n. 28, p. 3252–3259, 14 jun. 2016.
- BÖHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE, R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. **Protein Eng.**, v. 5, n. 3, p. 191–195, 1992.
- BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, 1 out. 2017.
- CASALE, P. A. O. Caracterização da resposta imune celular induzida pela imunização experimental com antígenos recombinantes de Plasmodium vivax Patricia Ostermayer Athayde Casale Caracterização da resposta imune celular induzida pela imunização experimental com antígenos. p. 100, 2013.
- CHÊNE, A. et al. Clinical development of placental malaria vaccines and immunoassays harmonization: a workshop report. **Malaria journal**, v. 15, p. 476, 2016.
- CHENET, S. M. et al. Genetic diversity and population structure of genes encoding vaccine candidate antigens of Plasmodium vivax. **Malaria journal**, v. 11, p. 68, 14 mar. 2012.
- CHESNE-SECK, M.-L. et al. Structural comparison of apical membrane antigen 1 orthologues and paralogues in apicomplexan parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 55–67, 2005.
- CLEMENS, J.; MOORTHY, V. Implementation of RTS,S/AS01 Malaria Vaccine — The Need for Further Evidence. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 26, p. 2596–2597, 30 jun. 2016.
- CRAWFORD, J. et al. Structural characterization of apical membrane antigen 1 (AMA1) from Toxoplasma gondii. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 20, p. 15644–52, 14 maio 2010.
- DATTA, D. et al. Comparative functional potency of DNA vaccines encoding Plasmodium falciparum transmission blocking target antigens Pfs48/45 and Pfs25 administered alone or in combination by in vivo electroporation in rhesus macaques. **Vaccine**, v. 35, n. 50, p. 7049–7056, 15 dez. 2017.
- DE CAMARGO, T. M. 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. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1118, 18 jan. 2018.
- DELGADILLO, R. F. et al. Stability of the Plasmodium falciparum AMA1-RON2 Complex Is Governed by the Domain II (DII) Loop. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0144764, 2016.
- DRAPER, S. J. et al. Recent advances in recombinant protein-based malaria vaccines. **Vaccine**, v. 33, n.

52, p. 7433–7443, 22 dez. 2015.

DREW, D. R. et al. Functional Conservation of the AMA1 Host-Cell Invasion Ligand Between *P. falciparum* and *P. vivax*: A Novel Platform to Accelerate Vaccine and Drug Development. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 217, n. 3, p. 498–507, 17 jan. 2018.

DUTTA, S. et al. Correction: Overcoming Antigenic Diversity by Enhancing the Immunogenicity of Conserved Epitopes on the Malaria Vaccine Candidate Apical Membrane Antigen-1. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, 24 jan. 2014.

DZIKOWSKI, R.; FRANK, M.; DEITSCH, K. Mutually Exclusive Expression of Virulence Genes by Malaria Parasites Is Regulated Independently of Antigen Production. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 3, p. e22, 2006.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 8 mar. 2004.

ELIAS, S. C. et al. Analysis of human B-cell responses following ChAd63-MVA MSP1 and AMA1 immunization and controlled malaria infection. **Immunology**, v. 141, n. 4, p. 628–44, abr. 2014.

EPSTEIN, J. E. et al. Protection against *Plasmodium falciparum* malaria by PfSPZ Vaccine. **JCI insight**, v. 2, n. 1, p. e89154, 12 jan. 2017.

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

FRIED, M.; DUFFY, P. E. Designing a VAR2CSA-based vaccine to prevent placental malaria. **Vaccine**, v. 33, n. 52, p. 7483–7488, 22 dez. 2015.

GENTIL, F. et al. A recombinant vaccine based on domain II of *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1 induces high antibody titres in mice. **Vaccine**, v. 28, n. 38, p. 6183–6190, 2010.

GIMENEZ, A. M. 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. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1275, 2017.

GONC, R. M. et al. Genome-wide diversity and differentiation in New World populations of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. p. 1–24, 2017.

GOOD, M. F.; MILLER, L. H. Interpreting challenge data from early phase malaria blood stage vaccine trials. **Expert Review of Vaccines**, v. 17, n. 3, p. 189–196, 2018.

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 2, p. 221–224, 1 fev. 2010.

GRAVES, S. F. et al. Strain-specific *Plasmodium falciparum* multifunctional CD4+ T cell cytokine expression in Malian children immunized with the FMP2.1/AS02A vaccine candidate. **Vaccine**, v. 34, n.

23, p. 2546–2555, 17 maio 2016.

GUY, A. J. et al. Structural patterns of selection and diversity for Plasmodium vivax antigens DBP and AMA1. **Malaria journal**, v. 17, n. 1, p. 183, 2 maio 2018.

HEIDENREICH, R. et al. A novel RNA-based adjuvant combines strong immunostimulatory capacities with a favorable safety profile. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 2, p. 372–384, 2015.

INVITROGEN, L. T. C. U. I. **Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression**. [s.l.: s.n.].

JIANG, J. et al. Plasmodium vivax merozoite surface protein-3 (PvMSP3): expression of an 11 member multigene family in blood-stage parasites. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63888, jan. 2013.

JOSLING, G. A.; LLINÁS, M. Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 573–587, 14 ago. 2015.

KASTILAN, R. et al. Improvement of a fermentation process for the production of two PfAMA1-DiCo-based malaria vaccine candidates in Pichia pastoris. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 11991, 20 set. 2017.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptor and RIG-I-like Receptor Signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1143, n. 1, p. 1–20, 1 nov. 2008.

KUSI, K. A. et al. Humoral Immune Response to Mixed PfAMA1 Alleles; Multivalent PfAMA1 Vaccines Induce Broad Specificity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. e8110, 1 dez. 2009.

KUSI, K. A. et al. Generation of humoral immune responses to multi-allele PfAMA1 vaccines; effect of adjuvant and number of component alleles on the breadth of response. **PloS one**, v. 5, n. 11, p. e15391, 2010.

KUSI, K. A. et al. Safety and immunogenicity of multi-antigen AMA1-based vaccines formulated with CoVaccine HT™ and Montanide ISA 51 in rhesus macaques. **Malaria journal**, v. 10, p. 182, 2011a.

KUSI, K. A. et al. Immunization with different PfAMA1 alleles in sequence induces clonal imprint humoral responses that are similar to responses induced by the same alleles as a vaccine cocktail in rabbits. **Malaria journal**, v. 10, p. 40, 14 fev. 2011b.

KUSI, K. A. et al. EDiP: the Epitope Dilution Phenomenon. Lessons learnt from a malaria vaccine antigen and its applicability to polymorphic antigens. **Expert Review of Vaccines**, p. 1–9, 11 dez. 2017.

LIMA, L. C. **Avaliação da imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas em antígenos de diferentes estágios do Plasmodium vivax expressos em Pichia pastoris**. [s.l.: s.n.].

MAIGA, B. et al. Human candidate polymorphisms in sympatric ethnic groups differing in malaria susceptibility in Mali. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e75675, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. [s.l.: s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE**. 1a edição ed. Brasília, DF:

Ministério da Saúde, 2017. v. 3

MONTERO, E. et al. Babesia divergens: identification and characterization of BdHSP-20, a small heat shock protein. **Experimental parasitology**, v. 119, n. 2, p. 238–45, jun. 2008.

MORAIS, C. G. et al. Antibodies to Plasmodium vivax apical membrane antigen 1: persistence and correlation with malaria transmission intensity. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 4, p. 582–7, out. 2006.

MÚFALO, B. C. et al. Plasmodium vivax apical membrane antigen-1: comparative recognition of different domains by antibodies induced during natural human infection. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 1266–1273, 2008.

NIELSEN, M. A. et al. The Influence of Sub-Unit Composition and Expression System on the Functional Antibody Response in the Development of a VAR2CSA Based Plasmodium falciparum Placental Malaria Vaccine. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0135406, 2015.

PAYNE, R. O. et al. Human vaccination against Plasmodium vivax Duffy-binding protein induces strain-transcending antibodies. **JCI insight**, v. 2, n. 12, 15 jun. 2017.

PEREIRA, M. D. O. Análise da resposta imune induzida pela imunização experimental com antígenos recombinantes de Plasmodium vivax. 2012.

PHILLIPS, M. A. et al. Malaria. 2017.

PIZARRO, J. C. et al. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5720, p. 408–11, 15 abr. 2005.

POYNTER, S. J.; DEWITTE-ORR, S. J. Understanding Viral dsRNA-Mediated Innate Immune Responses at the Cellular Level Using a Rainbow Trout Model. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 829, 23 abr. 2018.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the Plasmodium liver stage. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 849–856, nov. 2006.

RAMOS, C. H. I. A spectroscopic-based laboratory experiment for protein conformational studies\*. **Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 1, p. 31–4, 2004.

REMARQUE, E. J. et al. Apical membrane antigen 1: a malaria vaccine candidate in review. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 2, p. 74–84, 2008.

RICHARD, D. et al. Interaction between Plasmodium falciparum apical membrane antigen 1 and the rhoptry neck protein complex defines a key step in the erythrocyte invasion process of malaria parasites. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14815–22, 7 maio 2010.

ROCHA, M. V. et al. Generation, characterization and immunogenicity of a novel chimeric recombinant protein based on Plasmodium vivax AMA-1 and MSP119. **Vaccine**, v. 35, n. 18, p. 2463–2472, 25 abr.

2017.

RODRIGUES, M. H. C. et al. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant Plasmodium vivax apical membrane antigen-1. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 185–192, 2005.

ROOBSOONG, W. The In Vitro Invasion Inhibition Assay (IIA) for Plasmodium vivax. In: [s.l.] Humana Press, New York, NY, 2015. p. 187–196.

SALMAN, A. M. et al. Rational development of a protective P. vivax vaccine evaluated with transgenic rodent parasite challenge models. **Scientific reports**, v. 7, p. 46482, 18 abr. 2017.

SEDER, R. A. et al. Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. **Science (New York, N.Y.)**, v. 341, n. 6152, p. 1359–65, 20 set. 2013.

SIRIMA, S. B. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant Plasmodium falciparum AMA1-DiCo malaria vaccine adjuvanted with GLA-SE or Alhydrogel® in European and African adults: A phase 1a/1b, randomized, double-blind multi-centre trial. **Vaccine**, v. 35, n. 45, p. 6218–6227, 27 out. 2017.

SIRIMA, S. B.; COUSENS, S.; DRUILHE, P. Protection against malaria by MSP3 candidate vaccine. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 11, p. 1062–4, 15 set. 2011.

SRINIVASAN, P. et al. Binding of Plasmodium merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 32, p. 13275–80, 9 ago. 2011.

TACHIBANA, M. et al. Plasmodium vivax gametocyte protein Pvs230 is a transmission-blocking vaccine candidate. **Vaccine**, v. 30, n. 10, p. 1807–1812, 27 fev. 2012.

TEIXEIRA, L. H. et al. Immunogenicity of a prime-boost vaccine containing the circumsporozoite proteins of plasmodium vivax in rodents. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 2, p. 793–807, 2014.

THAM, W.-H.; BEESON, J. G.; RAYNER, J. C. Plasmodium vivax vaccine research – we’ve only just begun. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 2–3, p. 111–118, fev. 2017.

THE RTS, S. C. T. P. (2014). 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 Medicine**, v. 11, n. 7, p. e1001685, 29 jul. 2014.

THERA, M. A. et al. A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 11, p. 1004–13, 15 set. 2011.

THOMPSON, E. A. et al. TLR-adjuvanted nanoparticle vaccines differentially influence the quality and longevity of responses to malaria antigen Pfs25. **JCI Insight**, v. 3, n. 10, 17 maio 2018.

TRUMPFHELLER, C. et al. **Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity** *Journal of Internal Medicine*, 2012.

VALLEJO, A. F. et al. Global genetic diversity of the Plasmodium vivax transmission-blocking vaccine candidate Pvs48/45. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 202, 12 dez. 2016.

VICENTIN, E. C. et al. Invasion-inhibitory antibodies elicited by immunization with Plasmodium vivax apical membrane antigen-1 expressed in Pichia pastoris yeast. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1296–1307, 2014.

WHITE, N. J.; IMWONG, M. Relapse. **Advances in Parasitology**, v. 80, p. 113–150, 1 jan. 2012.

WHO. WORLD MALARIA REPORT 2015. 2015.

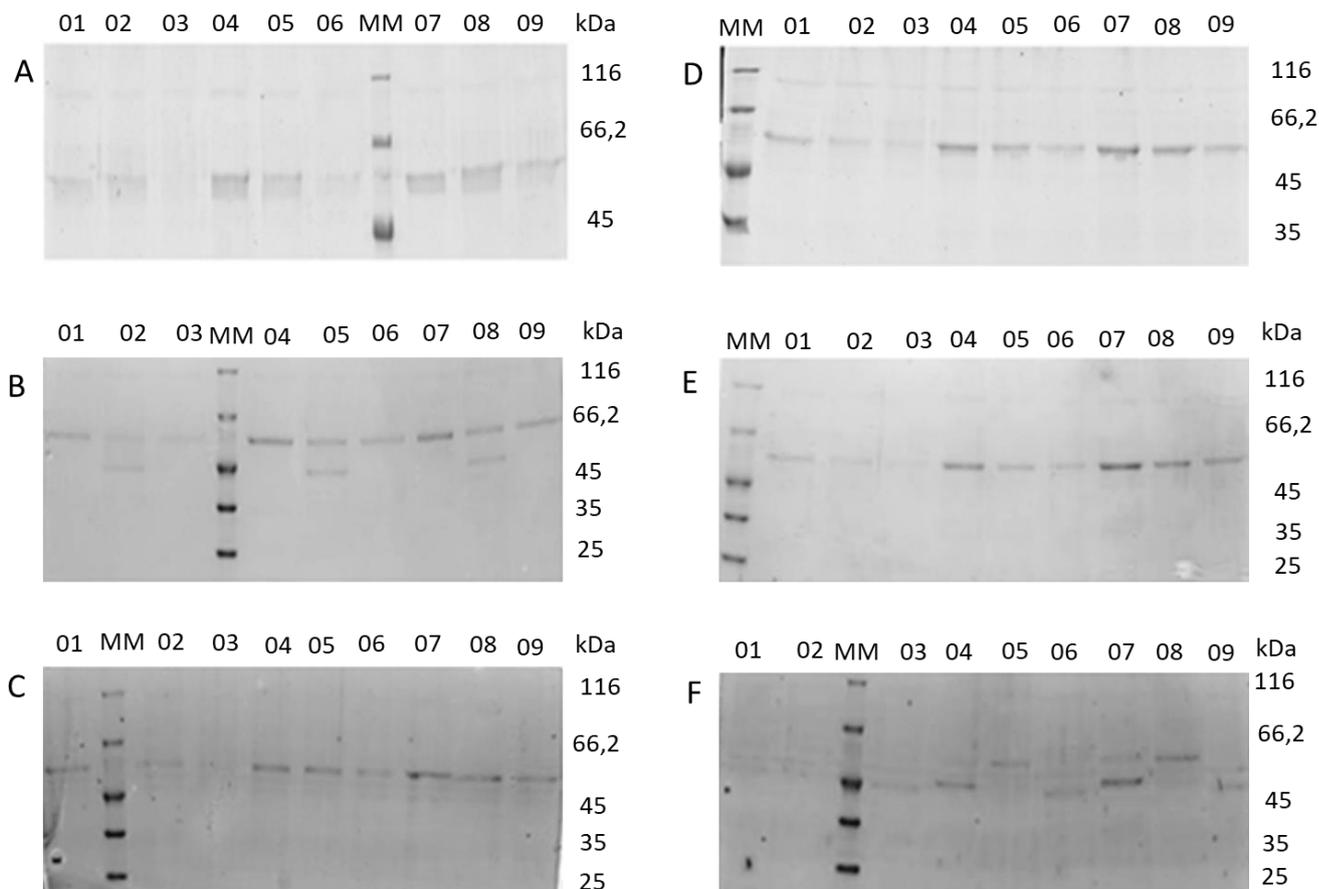
WHO. **World Malaria Report 2017**. [s.l.: s.n.].

WHO. Malaria vaccine: WHO position paper, January 2016 – Recommendations. **Vaccine**, 3 abr. 2017b.

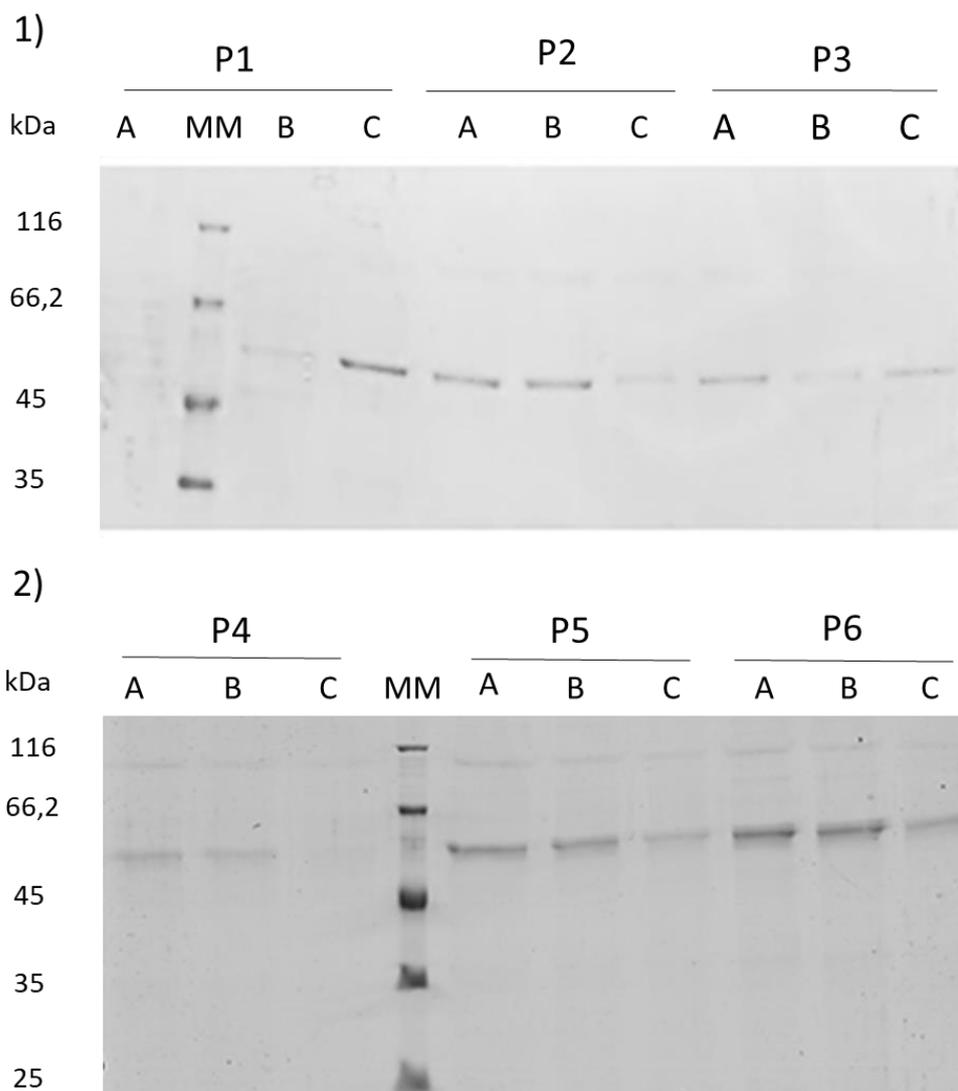
YAMAMOTO, M. et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5633, p. 640–3, 1 ago. 2003.

***MATERIAL SUPPLEMENTAR***

## MATERIAL SUPLEMENTAR



**Figura suplementar 1: Estabelecimento das condições para cultura dos novos clones PvAMA-1.** SDS-PAGE 12% corado com azul de coomassie apresentando a cinética de expressão das novas proteínas PvAMA-1 nas diferentes condições de cultura. A – PvAMA-1-Belem, B – PvAMA-1-PNG\_62\_MU, C – PvAMA-1-Chesson-I, D – PvAMA-1-SK0814-apical, E – PvAMA-1-Sal-I, F – PvAMA-1-Indonesia-XIX. 01-Resultado da expressão em meio 50% no tempo de 48h. 02- Resultado da expressão em meio 100% no tempo de 48h. 03-Resultado da expressão em meio 200% no tempo de 48h. 04-Resultado da expressão em meio 50% no tempo de 72h. 05-Resultado da expressão em meio 100% no tempo de 72h. 06-Resultado da expressão em meio 200% no tempo de 72h. 07-Resultado da expressão em meio 50% no tempo de 96h. 08-Resultado da expressão em meio 100% no tempo de 96h. 09-Resultado da expressão em meio 200% no tempo de 96h. MM – Marcador de massa molecular (Bio-Rad).



**Figura suplementar 2: Estabelecimento das condições de indução (metanol) para otimização da expressão das novas proteínas PvAMA-1.** SDS-PAGE 12% corado com azul de coomassie apresentando a cinética de expressão das novas proteínas PvAMA-1 sob diferentes condições de indução. Em 1) P1- PvAMA-1-Indonesiá-XIX, P2- PvAMA-1-Sal-I, P3- PvAMA-1-SK0814-apical. Em 2) P4 – PvAMA-1-Belem, P5- PvAMA-1-Chesson-I, P5- PvAMA-1-PNG\_62\_MU, MM – Marcador de massa molecular (Bio-Rad). A- Corresponde ao resultado da expressão com utilização de indutor na concentração de 0,5%. B- Corresponde ao resultado da expressão com utilização de indutor na concentração de 1,0%. C- Corresponde ao resultado da expressão com utilização de indutor na concentração de 2,0%.

***ANEXOS***

A1. O ANEXO 1 apresenta o certificado CEUA/FCF 32.2016 -P520 da aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CEUA/FCF 32.2016-P520

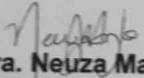
### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da imunogenicidade de diferentes formas alélicas da proteína recombinante PvAMA-1 expressa em Pichia pastoris: impacto da diversidade antigênica**, registrada com o nº 520, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Juliana Inês Branco** e supervisão do(a) **Profa. Dra. Irene da Silva Soares** – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **13 de abril de 2016**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	13/04/2016 a 31/07/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongos; C57BL/6
Número de animais	168
Peso/Idade	20-25g; 6-8 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério FCF/IQ - USP

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 24 de maio de 2016.

  
**Prof. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto**  
Vice-Coordenadora da CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP  
Telefone: (11) 3091 3622 - e-mail: ceuafcf@usp.br

A2. O ANEXO 2 apresenta o ofício CIBIo 001/2016 da aprovação do projeto pela Comissão Interna de Biossegurança.



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



Of. CIBIo 001/2016

São Paulo, 29 de fevereiro de 2016.

Prezada Professora,

Ref: "Impacto do polimorfismo de PvAMA-1 na imunogenicidade de proteínas recombinantes expressas na levedura *Pichia pastoris*

Pelo presente informamos a V.Sa. que a Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), em reunião ordinária realizada em 24 de fevereiro p.p., aprovou o projeto acima referido sob sua responsabilidade.

Sendo o que nos cumpria no momento, subscrevemo-nos

Cordialmente,

  
Prof. Dr. MÁRIO HIROYUKI HIRATA  
Presidente da CIBio

Ilma. Sra.  
Profa. Dra. IRENE DA SILVA SOARES  
FBC – FCF – USP

**A3.** O ANEXO 3 apresenta a Ficha do Aluno atualizada.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 9482551/1 - Juliana Inês Branco

Email: julianalb@usp.br  
Data de Nascimento: 15/06/1987  
Cédula de Identidade: RG - 4.873.606 - SC  
Local de Nascimento: Estado de Santa Catarina  
Nacionalidade: Brasileira  
Graduação: Farmacêutica - Universidade Federal de Santa Catarina - Santa Catarina - Brasil - 2013

Curso: Mestrado  
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
Área: Fisiopatologia  
Data de Matrícula: 15/07/2015  
Início da Contagem de Prazo: 15/07/2015  
Data Limite para o Depósito: 16/07/2018  
Orientador: Prof(a). Dr(a). Irene da Silva Soares - 20/09/2016 até o presente. Email: Isoares@usp.br  
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 15/07/2015  
Trancamento(s): 180 dias  
Período de 03/03/2017 até 29/08/2017  
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 12/09/2016  
Estágio no Exterior: University of Oxford, Inglaterra - Período de 18/07/2016 até 09/09/2016  
Data do Depósito do Trabalho:  
Título do Trabalho:  
Data Máxima para Aprovação da Banca:  
Data de Aprovação da Banca:  
Data Máxima para Defesa:  
Data da Defesa:  
Resultado da Defesa:  
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 15/07/2015  
Trancado em 03/03/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018

Impresso em: 11/06/2018 13:07:27



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Documento sem validade oficial  
FICHA DO ALUNO

9142 - 9482551/1 - Jullana Inês Branco

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-6/2	Tópicos em Análises Clínicas II	04/08/2015	16/11/2015	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5803-3/6	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	18/08/2015	31/08/2015	30	2	100	A	N	Concluída
BTC5703-6/2	Biologia Molecular (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	14/09/2015	22/11/2015	90	6	90	A	N	Concluída
FBA5728-4/1	Aprimoramento Pedagógico	03/11/2015	30/11/2015	60	4	97	B	N	Concluída
BMP5735-10/1	Seminários em Parasitologia I (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	19/02/2016	24/06/2016	60	4	85	B	N	Concluída
FBC5793-12/3	Tópicos em Análises Clínicas I	08/03/2016	20/06/2016	15	1	100	A	N	Concluída
FBT5776-5/3	Tópicos Especiais de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica II	17/10/2016	30/10/2016	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5707-6/1	Biologia de Sistemas para Ciências da Vida	26/10/2016	08/12/2016	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5727-4/2	Tópicos Avançados da Imunidade Inata Induzida por Fungos Patogênicos	07/11/2016	12/12/2016	60	4	100	B	N	Concluída
IOB5711-3/1	Redação de Trabalhos Científicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	07/03/2017	10/04/2017	45	0	-	-	N	Pre-matrícula indeferida
FBC5792-4/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia III	07/03/2017	19/06/2017	15	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BMP5786-2/1	Bases Científicas da Erradicação da Malária (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	13/03/2017	19/03/2017	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5710-7/1	Vacinas e Adjuvantes	13/11/2017	17/12/2017	60	4	100	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:  
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.  
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018  
Impresso em: 11/06/2018 13:07:27